

KINETISCHER NACHWEIS
MULTIPLER D-LSD-
BINDUNGSPROTEINE IM GEHIRN

Hartmut O. Kaiser

Diss.
Hr. München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0076

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abt. Neurochemie
Direktor Prof. Dr. H. Thoenen

KINETISCHER NACHWEIS MULTIPLER
D-LSD-BINDUNGSPROTEINE IM GEHIRN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hartmut O. Kaiser
aus
München

1 9 8 4

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Matussek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Hippus

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.3.1985

Herrn Horst Theilemann
in Dankbarkeit gewidmet

ABSTRACT

KAISER, HARTMUT OSKAR

KINETISCHER NACHWEIS MULTIPLER D-LSD-BINDUNGSPROTEINE IM GEHIRN.

Mittels kinetischer Untersuchungsmethoden konnten in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns drei Typen hochaffiner d-LSD-Bindungsproteine A, B und C nachgewiesen werden. Sie lassen sich durch drei Halbswertszeiten der Dissoziation des gebundenen radioaktiv markierten d-LSD von diesen Bindungsstellen charakterisieren: Typ A wird durch eine Halbswertszeit (HWZ) zwischen 3 und 10 Min., Typ B durch eine HWZ zwischen 20 und 60 Min. sowie Typ C durch eine HWZ von 100 Min. und darüber gekennzeichnet (bei 25°C).

Mittels differenzieller Besetzung dieser d-LSD-Bindungsstellen durch unmarkierte Pharmaka konnten Hinweise auf die Identität dieser Rezeptorenklassen gefunden werden, da die schnell dissozierende Komponente A bevorzugt von den Aminen Serotonin, 5-Methoxytryptamin und Dopamin und die langsame Komponente C durch Lysergsäurediäthylamid-Derivate besetzt wurde. Tryptamin besetzte in einer Konzentration von 40 μ M quantitativ die Komponente B. In der Fraktion Synaptischer Membranen, in der nur zwei Komponenten nachweisbar waren, war eine quantitative Besetzung der Komponente A durch 160 nM Serotonin möglich.

Es fanden sich Hinweise auf eine Kooperativität der Komponente B bei nichtlinearem Verlauf der Aktivierungsenergie des Komplexzerfalls in der Arrhenius-Darstellung. Die Aktivierungsenergien waren 7,6 Kcal für die Komponente A, 18,7 Kcal unterhalb von 27°C und 5,5 Kcal oberhalb dieser Sprungtemperatur für die Komponente B sowie 10,8 Kcal für die Komponente C. Es fanden sich ferner Hinweise auf eine kooperative Wirkung des Tryptamins mit einem "Hill-Koeffizienten" von 2 im Konzentrationsbereich von 30 bis 100 μ M in den Verdrängungsstudien. Für d-LSD kann eine kooperative Wirkung ausgeschlossen werden.

Weitere Evidenzen für die Existenz des LSD-Bindungsproteins Typ B wurden durch Experimente erhalten, bei denen es gelang, die Bindungsstellen vom Typ A und C durch irreversible Reaktion mit Phenoxybenzamin weitgehend auszuschalten. Dadurch wurden die Voraussetzungen geschaffen für künftige pharmakologische Untersuchungen der Komponente B im Membranverband.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Materialien und Methoden
 - 2.1. Präparation der Gewebeprobe und subzellulären Fraktionen
 - 2.1.1. Präparation der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns
 - 2.1.2. Präparation der subzellulären Fraktionen
 - 2.2. Bindungstestverfahren zum Nachweis hochaffiner [^3H]-d-LSD-Bindung
 - 2.2.1. Filtrationsverfahren
 - 2.2.2. Methodik der Zerfallsversuche
 - 2.2.3. Bindungstest im Ultrazentrifugationsverfahren
 - 2.3. Radioaktivitätsbestimmung
 - 2.4. Proteinbestimmung
 - 2.5. Chemikalien
3. Ergebnisse
 - 3.1. Verhalten der hochaffinen d-LSD-Bindung gegenüber den divalenten Kationen Kalzium und Magnesium in der Gesamtmembranfraktion und in subzellulären Membranpräparationen des Rattengroßhirns
 - 3.1.1. Einfluß von Kalzium und Magnesium auf die [^3H]-d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion
 - 3.1.2. Einfluß von Kalzium und Magnesium auf die [^3H]-d-LSD-Bindung in subzellulären Fraktionen des Rattengroßhirns
 - 3.1.2.1. [^3H]-d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion unter Kalzium- und Magnesiumchlorid
 - 3.1.2.2. Verminderte [^3H]-d-LSD-Bindung in Synaptosomalen Membranen unter Kalziumchlorid
 - 3.1.3. Bindungsstudien mittels Ultrazentrifugation
 - 3.1.4. Hochaffine [^3H]-d-LSD-Bindung in der Fraktion schwerer mikrosomaler Membranen sowie Synaptischer Membranen: Darstellung nach Scatchard

- 3.2. Zur pharmakologischen Spezifität der [^3H]-d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion:
 - 3.2.1. Verdrängungsstudien mit einer Auswahl unmarkierter Substanzen
 - 3.2.2. Kinetische Untersuchungen
 - 3.2.2.1. Experimente mit dem Zerfall der im Gleichgewicht stehenden [^3H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe, induziert durch unmarkiertes d-LSD: Isotopenverdünnungsmethode
 - 3.2.2.1.1 Das Problem der unspezifischen Bindung in den Zerfallsexperimenten
 - 3.2.2.1.2 Ergebnisse der Zerfallsversuche
 - 3.2.2.1.3 Die Halbwertszeiten im Zerfallsversuch
 - 3.2.2.1.4 Die Aktivierungsenergien des Zerfalls der [^3H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe
 - 3.2.2.1.5 Der Einfluß des Tryptamins auf die [^3H]-d-LSD-Bindung im Zerfallsexperiment
 - 3.2.2.1.6 Zerfallsversuche mit Synaptischen Membranen, erste Ergebnisse
 - 3.2.2.2. Zur Frage der Kooperativität: Zerfallsversuche in Volumenverdünnungsmethode
 - 3.2.2.2.1 Die Spezifität der d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns in der Volumenverdünnungsmethode
- 3.3. Phenoxybenzamin: Irreversible Hemmung der [^3H]-d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion
 - 3.3.1. Irreversible Blockade der [^3H]-d-LSD-Bindungsproteine in der Gesamtmembranfraktion durch Phenoxybenzamin: Darstellung nach Scatchard
- 4. Diskussion
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Heterogenität der Bindungsstellen für d-Lysergsäurediäthylamid (d-LSD) in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns, wie sie in vorausgegangenen Arbeiten aufgezeigt wurde (32,51), näher zu definieren. Es sollte mit biochemischen und pharmakologischen Methoden versucht werden, die verschiedenen Typen von Bindungsproteinen und Rezeptoren, die d-LSD hochaffin zu binden vermögen, ohne aufwendige Präparation von topographischen Hirnarealen innerhalb der Gesamtmembranfraktion des Großhirns zu differenzieren und nach Möglichkeit den in Frage kommenden Neurotransmitter-Rezeptoren zuzuordnen.

Diese putativen Rezeptortypen sind neben dem immer noch hypothetischen spezifischen d-LSD-Rezeptor, der für die Vermittlung der halluzinatorischen Wirkungen des d-LSD verantwortlich sein soll, die Rezeptoren für Serotonin (5-HT) (51, 66), für Dopamin (2,51,54) und für Tryptamin (56). Daneben werden weitere Bindungsproteine diskutiert, die ebenfalls d-LSD hochaffin binden. Hierzu zählt ein Bindungsprotein für Dihydroergotamin (7). Weiter werden aufgrund elektrophysiologischer Befunde die Rezeptoren für Serotonin in prae- und postsynaptische Subpopulationen unterschieden (59), so daß Hinweise auf eine Heterogenität von Neurotransmitter-Rezeptoren auch im intakten Zellverband gefunden werden konnten.

Heute unterscheidet man aufgrund der Ergebnisse von Verdrängungsversuchen mit Rezeptor-Antagonisten und Agonisten

im serotonergen System zwischen sogenannten S_1 -Rezeptoren, die bevorzugt durch Serotonin und wahrscheinlich auch Lisurid (23) besetzt werden und hauptsächlich im Kortex (51) vorkommen, sowie S_2 -Rezeptoren, die neben Serotonin mit hoher Affinität durch Spiperone, Mianserin und Ketanserin markiert werden (29,30,37,40,41,50,51). Daneben konnten mehrere Typen von serotonininsensitiven Adenylatzyklasten im ZNS nachgewiesen werden (28), so daß zusammen mit den Autorezeptoren für Serotonin (A_1 - und A_2 -Rezeptoren (59,63)) mindestens 5 Bindungsstellentypen für Serotonin unterschieden werden können (23).

Auch im dopaminergen System werden heute D_1 -Rezeptoren, die mit der dopaminsensitiven Adenylatzyklase assoziiert sind (33,54) von den D_2 -Rezeptoren unterschieden, die nicht mit Adenylatzyklasten in Verbindung stehen und die hauptsächlich durch Neuroleptica bzw. Butyrophenone, z.B. Haloperidol, Spiroperidol und Domperidon markiert werden (22,67). Auch ein praesynaptischer Autorezeptor für Dopamin wird diskutiert (33). D-LSD als gemischter Antagonist und Agonist des Serotonins bindet im zerebralen Kortex bevorzugt an Serotonin-Rezeptoren und im Striatum bevorzugt an Dopamin-Rezeptoren (51). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war zwar teilweise bekannt oder konnte zumindest vermutet werden, daß d-LSD aufgrund seiner Struktur mit den zitierten Rezeptoren in Wechselwirkung treten kann, nicht bekannt war aber, daß sich diese Wechselwirkungen alle im Nanomolbereich, das heißt also mit Dissoziationskonstanten zwischen eins und zehn Nanomol pro Liter abspielen.

Obgleich Mehl et al bereits 1974 multiple d-LSD-Serotonin-Bindungsproteine mittels affinitätschromatographischer Auftrennung dieser solubilisierten Membranproteine im Schweinegroßhirn nachweisen konnten (47), wurde noch im Jahre 1976 von maßgeblichen Arbeitsgruppen vom Vorliegen eines einheitlichen Typs einer hochaffinen Bindungsstelle für d-LSD in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns ausgegangen (3,4). Spätere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe (51), andere Autoren (66) und eigene Untersuchungen zeigten dann, daß im Rattengroßhirnhomogenat mindestens zwei Bindungsstellen mit höherer Affinität für d-LSD vorliegen (32,46,64). Wie sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit herausstellte, bindet d-LSD mit vergleichbar niedriger Dissoziationskonstanten an die Rezeptoren für Serotonin (51,66), Dopamin (2,54) und wahrscheinlich, wie erst jetzt gezeigt werden konnte, auch Tryptamin (5), so daß sich eine Differenzierung dieser Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion als schwierig erwies. Trotzdem gelang es aber doch, einige Erkenntnisse über die Bindung des d-LSD an diese Rezeptoren zu gewinnen, was hauptsächlich durch Anwendung der kinetischen Zerfallsmethode nach halbmaximaler Blockade dieser Bindungsstellen mit unmarkierten Pharmaka beziehungsweise Neurotransmittern möglich war. Mit dieser Methode ließen sich auch Hinweise auf das Vorliegen von kooperativen Bindungsstellen für d-LSD finden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Präparation der Gewebeproben und subzellulären Fraktionen.

2.1.1. Präparation der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns.

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Jautz, Kissleg) mit einem Körpergewicht von 200 bis 260 g dekapitiert und das Gehirn so schnell wie möglich entnommen. Das Großhirn wurde rostral der Vierhügelplatte vom Mittelhirn abgetrennt. So wurden je Ratte etwa 1,2 g Großhirngewebe und 0,3 g Kleinhirn erhalten.

Jeweils 10 Gehirne (entsprechend 12 g Gewebe) wurden in 108 ml eiskaltem destilliertem Wasser, entsprechend einer Verdünnung von 1:10 (w/v) mit der Schere zerkleinert und im Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) mit jeweils 5 Hüben bei 1000 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Dabei wurde ein Homogenisator mit enger Toleranz benutzt. Das Homogenat wurde für 10 Minuten bei 800xg, entsprechend 2.700 UpM mit Rotor SS 34, Sorvall, zentrifugiert und der Überstand 60 Minuten lang bei 100.000xg (entsprechend 35.000 UpM mit Rotor Ti 35, Beckman) sedimentiert. Der Niederschlag wurde in der gleichen, dem Überstand entsprechende Menge Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,4, mit 150 mM KCl) aufgenommen und resuspendiert, 20 Minuten bei 0°C stehengelassen und wieder bei 100.000xg über 60 Minuten sedimentiert. Dieses Sediment wurde zweimal in eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und re-sedimentiert, so daß schließlich eine gewaschene Gesamtmembranfraktion der Verdünnung 1:10

in destilliertem Wasser vorlag. Die Suspension wurde dann in 10 ml Kunststoffszintillationszählgefäßen in Portionen zu jeweils 4,5 ml tiefgefroren und bei -40°C bis -60°C aufbewahrt.

2.1.2. Präparation der subzellulären Fraktionen.

Die Präparation von subzellulären Fraktionen des Rattengroßhirns erfolgte in einem modifizierten Verfahren nach Jones und Matus (31). Dabei wurden jeweils 10 Rattengroßhirne, die wie oben beschrieben, gewonnen wurden, in 9 Volumina zehnpromzentiger Saccharoselösung (w/w) mit 6 Hüben bei 250 Umdrehungen pro Minute im Potter-Homogenisator homogenisiert. Nach Sedimentieren bei $1000\times g$ über 25 Minuten (3000 UpM Rotor SS 34, Sorvall) wurde das Sediment in der dem Überstand entsprechenden Menge 10%iger Saccharoselösung (w/w) resuspendiert und erneut sedimentiert. Die kombinierten Überstände dieser beiden Zentrifugationsschritte wurden zweimal für 40 Minuten bei $10.000\times g$ (9.500 UpM, Rotor SS 34, Sorvall) zentrifugiert und die dabei erhaltenen Überstände, die angereichert mikrosomale Membranen enthalten, aufbewahrt. Die Sedimente wurden jeweils in 10 ml hypoosmotischen Puffer, bestehend aus 2,5 mM Tris-HCl, pH 7,5, resuspendiert und für 30 Minuten bei 0°C osmotisch geschockt. Dann wurden jeweils 20 ml einer 40%igen (w/w) Saccharoselösung dazugegeben und diese Suspension in Zellulose-Acetat-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Jeweils 30 ml dieser Suspension wurden dann vorsichtig mit einer Pipette mit 20 ml einer 28,5%igen (w/w) Saccharoselösung überschichtet, diese wiederum mit 5 ml der

10%igen Saccharoselösung. Alle Saccharosekonzentrationen wurden diffraktometrisch kontrolliert. Die so erhaltenen diskontinuierlichen Saccharosegradienten wurden 110 Minuten bei 60.000xg entsprechend 22.500 UpM im Swing-out-Rotor SW 25 (Beckman) zentrifugiert. Nach dem Lauf konnte an der Trennschicht zwischen der 34%igen und der 28,5%igen Saccharoselösung eine mit Synaptischen Membranen angereicherte Proteinfraktion, in der Originalarbeit (31) als "Fraktion 2" bezeichnet, gewonnen werden.

Analog wurde bei der Gewinnung Synaptischer Membranen des Kortex und der subkortikalen Gehirnnareale verfahren. Das Kortexgewebe wurde mit einem Spatel abgetragen und separat von den subkortikalen Gehirnnarealen homogenisiert.

Mikrosomale Membranen wurden aus den sich bei der Präparation der Synaptischen Membranen ergebenden Zentrifugationsüberständen angereichert. Dazu wurden diese Überstände bei 100.000xg sedimentiert und zweimal in destilliertem Wasser gewaschen. Mikrosomale Membranen wurden teilweise auch nach Bennett und Snyder (4) in "schwere" und "leichte" Mikrosomen durch Zentrifugieren dieser Überstände über 60 Minuten bei 20.000xg aufgetrennt. Das dabei entstehende Sediment entsprach den schweren Mikrosomen, aus dem Überstand wurden dann durch Zentrifugation über 60 Minuten bei 100.000xg die leichten Mikrosomen gewonnen. Auch diese Fraktionen wurden zweimal mittels Zentrifugation in destilliertem Wasser nachgewaschen und die dabei anfallenden Überstände verworfen.

2.2. Bindungstestverfahren zum Nachweis hochaffiner [^3H]-d-LSD Bindung.

2.2.1. Filtrationsverfahren

Es wurde ein modifiziertes Bindungstestverfahren mittels Filtration über Glasfaserfilter, wie es von Pert und Snyder (52) angegeben wurde, für die vorliegenden Untersuchungen angewandt. Dabei wurden die zu untersuchenden Membranproteine in Eppendorfgefäßen (Netheler & Hinz, Eppendorf) im Ultrathermostaten bei 25°C über 90 Minuten mit dem radioaktiv markierten d-LSD inkubiert. Wie aus Vorarbeiten ersichtlich, ist nach 90 Minuten bei 25°C das Gleichgewicht der Bindungseinstellung erreicht (32). Der Standard-Inkubationsansatz bestand aus 300 µl einer vorverdünnten Gesamtmembranfraktion in destilliertem Wasser (1 Teil Stammfraktion 1:10 verdünnt und 1,2 Teile destilliertes Wasser), sowie jeweils 150 µl vierfach konzentrierter [^3H]-d-LSD-Lösung in Tris-HCl-Puffer (50 mM , pH 7,4) und 150 µl einer vierfach konzentrierten Lösung der für die jeweilige Untersuchung benötigten Substanz in 50 mM Tris-HCl-Puffer vom pH 7,4. Alle Lösungen wurden wöchentlich frisch vorbereitet und bei 4°C aufbewahrt. Von der Gesamtmenge der Inkubations-suspension von 600 µl wurden 500 µl entnommen, auf ein in einem Büchner-Trichter befindliches angefeuchtetes Glasfaserfilter (Whatman GF/B) gegeben und mit 2x10 ml eisgekühltem Puffer (Tris-HCl, 25 mM , pH 7,4) nachgespült. Das Vakuum wurde durch eine Kolbenpumpe, die über eine Vakuumfalle an das Filtersystem angeschlossen war, erzeugt und war

somit konstant. Der gesamte Filtrations- und Waschvorgang dauerte zwischen 6 und 10 Sekunden. Verlängerte Waschzeiten, die durch Verstopfen der Glasfritte durch Protein usw. verursacht werden konnten, wurden durch regelmäßige Reinigung der Glasfritte vermieden. Die auf das Glasfaserfilter aufgebrachte Proteinmenge betrug bei der Gesamtmembranfraktion zwischen 1,48 mg und 1,70 mg. Bei anderen Membranpräparationen wurden teilweise andere Proteinmengen eingesetzt.

2.2.2. Methodik der Zerfallsversuche

Das Standardbindungstestverfahren wurde folgendermaßen modifiziert: Die Inkubation wurde in Szintillationsgläsern (Wheaton) durchgeführt. Dabei wurden 2 ml der vorverdünnten Gesamtmembranfraktion (1+1,2 Teile dest. Wasser) mit 6 ml dest. Wasser, in 4 ml Tris-HCL-Puffer (50 mM, (PH 7,4) und 4 ml einer 8 nM [3 H]-d-LSD-Lösung in Tris-HCL-Puffer (50 mM, PH 7,4) für 90 Min. bei 25°C im Ultrathermostaten inkubiert. Nach Gleichgewichtseinstellung wurde der Zerfall der [3 H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe durch Zugabe von 120 μ l einer 1,2 mM Lösung unmarkierten LSD eingeleitet. Es wurden dann Aliquote von 500 μ l aus dem Inkubationsgemisch zu den verschiedenen Zeiten entnommen und entsprechend dem Standardbindungsverfahren über Glasfaserfilter filtriert.

Bei der Volumenverdünnungsmethode wurde nach Einstellung des Gleichgewichts nach 90 Min. das Inkubationsgemisch (16 ml) mit 320 ml Tris-HCL-Puffer von 25°C (25 mM, pH 7,4)

20-fach verdünnt. Der Zerfall wurde dann durch Entnahme von jeweils 10 ml des Gemisches und Filtrieren über Glasfaserfilter entsprechend dem Standardverfahren verfolgt. Bei diesen Versuchsreihen wurde wegen des großen Volumens der Probe nur einmal mit 10 ml eiskaltem Tris-HCL-Puffer (25 mM, pH 7,4) nachgespült. Die Leerwerte mußten für diese Versuchsreihen wegen des Filtrationsschrittes bei 25°C separat bestimmt werden, außerdem mußte eine Korrektur für die Restbindung eingeführt werden (vgl. Abschnitt 3.2.2.1.1).

2.2.3. Bindungstest im Ultrazentrifugationsverfahren

Nach Inkubation unter Standardbedingungen (siehe 2.2.1) wurden die Proben in eiskaltem Wasser auf 4°C gebracht und 60 Min. bei 100.000 × g zentrifugiert. Dazu wurden speziell dafür angefertigte Kunststoffadaptoren für den Rotor Ti-50 (Beckman) verwendet. Der Überstand wurde wie früher beschrieben abgesaugt (32), die Spitze des Eppendorf-Gefäßes mit einer Rasierklinge abgetrennt und in das Szintillationsglas gegeben. Nach Auflösen der Sedimente durch Schütteln in 1 ml 5%iger Natriumdodecylsulfat-Lösung wurde die Radioaktivität flüssigkeitsszintigraphisch bestimmt (vergl. 2.3.).

2.3. Radioaktivitätsbestimmung

Die Glasfaserfilter mit den adsorbierten Membranproteinen und dem radioaktiv markierten Liganden wurden nach dem Filtrationsvorgang in Kunststoff-Szintillations-Gläser (Zinsser-Szintillators, Frankfurt) gegeben und mit 10 ml Unisolve I (Koch-Light, Colnbrook-Bucks), versetzt und kurz auf dem Vortex-Schüttler energisch geschüttelt. Nach weiteren 30 bis 45 Minuten Schütteln auf einem Laborschüttler waren die Glasfaserfilter vollständig von der Szintillatorflüssigkeit durchtränkt und kaum mehr sichtbar. Die Zählung der Impulse erfolgte nach mindestens 6-stündigem Angleichen über jeweils 10 Min. in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler Mark II (Nuclear-Chicago), später in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler der Firma Berthold.

2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lowry et al (42) mit Albumin aus Rinderserum (Serva, Heidelberg) als Standard. Die unlöslichen Membranproteine wurden mit ein-normaler Natronlauge 90 Minuten bei 95° C hydrolysiert.

2.5 Chemikalien

Das radioaktiv markierte d-LSD stammte von NEN, Boston. Zuletzt wurde ein an der N-Methylgruppe tritiiertes d-LSD mit einer spezifischen Aktivität von 52,6 Ci/mM benutzt. Unmarkiertes d-LSD-Tartrat, 2-Bromo-d-Lysergsäurediäthylamid-Bitartrat (BOL) und Methysergid wurde freundlicherweise von

Sandoz, Nürnberg, Lisurid-Hydrogenmaleat von Schering, Berlin, und Methergolin von Farmitalia, Mailand, zur Verfügung gestellt. Bufotenin-Oxalathydrat und Tryptamin/HCl stammen von Serva, Heidelberg, Serotonin-Kreatininsulfat von Roth, Karlsruhe, 5-Methoxytryptamin, 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin, Dopamin-Hydrochlorid und Pargylin-Hydrochlorid von Sigma, St. Louis und München. Apomorphin-Hydrochlorid stammte von Merck, Darmstadt, Phenoxybenzamin-Hydrochlorid von Smith, Kline & French, Philadelphia, Cyproheptadin-Hydrochlorid von Merck, Sharp und Dohme sowie Prazosin von Pfizer, Karlsruhe.

Alle sonstigen und nicht besonders bezeichneten Chemikalien stammten von Merck, Darmstadt und waren analysenrein.

3. Ergebnisse

3.1. Verhalten der hochaffinen d-LSD-Bindung gegenüber den divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} in der Gesamtmembranfraktion und in subzellulären Membranpräparationen des Rattengroßhirns

3.1.1. Einfluß von Kalzium und Magnesium auf die [^3H]-d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion

Als Vorversuch wurde die Gesamtbindung von [^3H]-d-LSD an die Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von CaCl_2 und MgCl_2 gemessen. Es ergab sich die in Abbildung 1 gezeigte Abhängigkeit. Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid aktiviert die [^3H]-d-LSD-Bindung bei 20 nM Endkonzentration bis zu einer maximalen Konzentration von 10 mM, bei höheren Salzkonzentrationen wird die d-LSD-Bindung in zunehmendem Maß gehemmt. Im Bereich von 0,2 mM bis 2,0 mM entsprechend der physiologischen Serumkonzentrationen von Ca^{2+} (2,25 bis 2,70 mM) und Mg^{2+} (0,80 bis 1,00 mM) beim Menschen (19) hemmt Kalzium die d-LSD-Bindung leicht, während Magnesium die d-LSD-Bindung bereits um 16 Prozent der Kontrolle aktiviert. Dagegen bewirken die monovalenten Kationen Natrium, Kalium und Lithium in zunehmender Konzentration eine kontinuierliche Zunahme der Hemmung (32). Die Hemmwirkung der monovalenten Kationen wurde in Abbildung 1 zusätzlich noch für NaCl im Bereich von 0,1 bis 100 mM gezeigt. Den schwächsten Einfluß auf die [^3H]-d-LSD-Bindung im

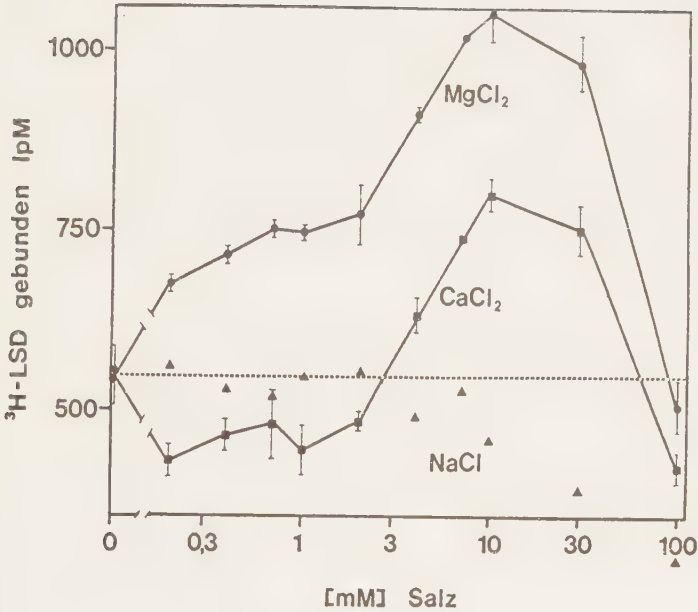


Abbildung 1: [³H]-d-LSD-Bindung an die Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns: Abhängigkeit der Gesamtbindung von der Salzkonzentration. Entsprechend dem Standard-Bindungsverfahren wurde die Gesamtmembranfraktion mit CaCl₂ (■) und Mg Cl₂ (●) in den angegebenen Konzentrationen 90 Min. bei 25°C inkubiert und über Glasfaserfilter filtriert. Die Proteinkonzentration war 1,0 mg/ml und die Endkonzentration an [³H]-d-LSD war 20,0 nM. NaCl (▲) diente als Vergleichs-Elektrolyt. Dreifachbestimmung. Die senkrechten Balken repräsentieren die Standardabweichung, berechnet nach

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} .$$

Bereich niedriger Konzentrationen hatte im Vergleich zu den Kontrollen ohne Salzzusatz das Kaliumion (32), so daß in den folgenden Versuchen Kaliumchlorid den Kontrollen zum Angleich der Ionenstärke zugesetzt wurde.

In diesen Versuchen sollte nun geklärt werden, ob und inwieweit die aktivierende Wirkung von Kalzium und Magnesium auf die d-LSD-Bindung spezifisch für die verschiedenen Bindungsstellen ist.

3.1.2. Einfluß der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die d-LSD-Bindung in subzellulären Fraktionen des Rattengroßhirns

Es wurden insgesamt drei subzelluläre Membranfraktionierungen auf ihre hochaffine d-LSD-Bindungskapazität und Aktivierbarkeit durch divalente Kationen untersucht. Die Präparation der Fraktionen erfolgte nach einem modifiziertem Verfahren nach Jones und Matus (31). Zur Prüfung der Identität der Fraktionen wurden bei der ersten Präparation Leitenzymbestimmungen durchgeführt; nachdem die beiden anderen Präparationen in analoger Weise durchgeführt wurden, wurde auf weitere Enzymbestimmungen verzichtet, um so mehr Material für die Bindungstests einsetzen zu können. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Kalzium und Magnesium zeigen einen unterschiedlichen Einfluß auf die hochaffine d-LSD-Bindung in den einzelnen subzellulären Fraktionen: Schwere mikrosomale Membranen, sedimentiert bei $20.000 \times g$ (4), zeigen das identische Aktivierungsmuster wie die Gesamtmembranfraktion: Kalzium

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Kationen auf die hochaffine spezifische [³H]-d-LSD-Bindung an subzelluläre Fraktionen und die Gesamtembranfraktion des Rattengroßhirns.
Bindung von [³H]-d-LSD in 10⁻¹³ Mol/mg Protein sowie Prozent der Kontrolle mit Kaliumchlorid

Fraktion	ohne	%	Ca ²⁺ 10 mM	%	Mg ²⁺ 10 mM	%	Na ⁺ 15 mM	%	K ⁺ 15 mM	%
Homogenat	4,20 ± 0,64 ³	130	4,68 ± 0,10 ¹	145	5,26 ± 0,25 ¹	163	2,98 ± 0,25 ⁶	92	3,23 ± 0,22	100
Synaptische Membranen	5,16 ± 0,22 ⁷	98	4,22 ± 0,59 ³	80	5,26 ± 0,50 ⁷	99	4,86 ± 0,30 ⁶	92	5,29 ± 0,35	100
Mikrosomen 20	6,92 ± 0,66 ⁴	115	7,31 ± 0,68 ⁵	121	7,51 ± 0,64 ⁶	125	5,70 ± 0,42 ⁷	95	6,02 ± 1,23	100
Mikrosomen 100	3,08 ± 0,24 ⁷	98	3,09 ± 0,16 ⁷	99	3,46 ± 0,25 ⁵	110	2,80 ± 0,42 ⁷	89	3,13 ± 0,22	100
Myelin	0,41 ± 0,12 ⁷	86	0,35 ± 0,12 ⁶	72	0,36 ± 0,05 ⁵	75	0,36 ± 0,17 ⁷	75	0,48 ± 0,10	100
Mitochondrien *)	0,57 ± 0,10 ¹	40	0,60 ± 0,34 ⁴	43	1,20 ± 0,47 ⁷	84	1,04 ± 0,49 ⁷	73	1,42 ± 0,34	100
Kerne	3,99 ± 0,47 ⁷	102	4,40 ± 0,52 ⁶	113	4,50 ± 0,69 ⁶	115	3,65 ± 0,31 ⁷	93	3,91 ± 0,36	100

Fraktionen nach Jones und Matus (31) wurden sedimentiert und zweimal mit dest. Wasser nachgewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 100.000 × g über 1 h bei 4°C durchgeführt. Dann wurden die Proteinfraktionen dem Bindungstest nach dem Standard-Verfahren bei einer Endkonzentration von 2,0 nM radioaktiv markiertem d-LSD unterzogen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart einer Endkonzentration von 2,0 μM unmarkiertem d-LSD gemessen und subtrahiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lowry et al (42). Es wurden drei subzelluläre Präparationen angefertigt, wobei jede Fraktion dreifach bestimmt wurde, so daß die Werte der Tabelle neunfach bestimmt sind. Zur statistischen Bearbeitung wurden die Werte normiert, die Signifikanzberechnung erfolgte nach dem t-Test. Die Signifikanz sind wie folgt:

- 1: P < 0,0005
 - 2: P < 0,001
 - 3: P < 0,005
 - 4: P < 0,01
 - 5: P < 0,025
 - 6: P < 0,05
 - 7: nicht signifikant
- *) Werte von nur zwei Präparationen

und Magnesium aktivieren in einer Konzentration von 10 mM gleichermaßen die hier hochaffine d-LSD-Bindung um 21 bzw. 25 Prozent der Kontrollen mit 15 mM Kaliumchlorid.

Leichte mikrosomale Membranen, sedimentiert bei 100.000xg (4), werden nur durch Magnesium um 10 Prozent der Kontrollen aktiviert und Kalzium hat keine Wirkung.

Das identische Aktivierungsmuster fand sich in den schweren und leichten Mikrosomen des Kortex und der subkortikalen Gehirnnareale (nicht in Tab. 1 gezeigt).

Die d-LSD-Bindungsstellen in der Fraktion der Synaptischen Membranen zeigen keinerlei Beeinflussung durch Magnesium, jedoch eine relativ starke Hemmung durch Kalziumchlorid. Die hochaffine Bindung wird hier durch 10 mM Kalziumchlorid auf 80 Prozent der Kontrolle reduziert. Die Hemmwirkung des Kalziumchlorids auf die hochaffine d-LSD-Bindung in Synaptischen Membranen ist ein empfindlicher Parameter zur Beurteilung der Reinheit dieser Membranpräparation: Eine im Zuge dieser Untersuchung angefertigte Präparation, die aus dem Saccharosegradienten als "Fraktion Synaptischer Membranen" gewonnen wurde, zeigte eine gute Aktivierbarkeit durch Kalziumchlorid, die sich als durch Kontamination mit mikrosomalen Membranen verursacht herausstellte.

3.1.2.1 Aktivierte d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion unter Kalzium- und Magnesiumchlorid.

Im Standardbindungstestverfahren wurden Kontrollen mit 15 mM KCl und Proben mit 10 mM Kalziumchlorid mit stei-

genden Konzentrationen [^3H]-d-LSD inkubiert. Die Analyse der Bindungskurve in der reziproken Darstellung nach Scatchard (61) nach deren Auflösung in asymptotische Bindungsgeraden nach Rosenthal (60) zeigte, daß beide Bindungskomponenten, die sich auf diese Weise in der Gesamtmembranfraktion und auch in der Fraktion schwerer mikrosomaler Membranen darstellen lassen, in ihrer Affinität zu d-LSD durch Kalziumchlorid nicht beeinflußt werden, sondern daß der Aktivierungseffekt auf einer Zunahme der apparenten Konzentration der Bindungsstellen, und zwar beider nachweisbarer Bindungsstellentypen beruht. Dabei wird die hochaffine Komponente um etwa 30 Prozent und die mittelaaffine um etwa 10 Prozent vermehrt. Der Aktivierungseffekt von Kalziumchlorid ist also nicht spezifisch für einen Typ von d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion. Es könnte sich deshalb auch um einen sekundären Effekt, etwa bedingt durch Inaktivierung von endogenen Liganden durch Komplexbildung usw., handeln. Versuche mit einer Vorinkubation, die in einer anderen Untersuchung (48) nach 10 Minuten einen Bindungsanstieg um 91 Prozent der Kontrolle durch Abbau von endogenem Serotonin brachte, beeinflussten nicht die Kalziumaktivierung der Gesamtmembranfraktion in vorliegender Arbeit, so daß eine Scheinaktivierung durch Abbau von endogenem Liganden während der Inkubation mit Ca^{2+} ausgeschlossen werden kann. Zum Ausschluß einer artifiziellen Scheinaktivierung durch Erhöhung der tatsächlich vorliegenden freien [^3H]-d-LSD-Konzentration im Inkubationsansatz durch die divalenten Kationen, wie sie z.B. durch Vermin-

derung der Adsorption des radioaktiv markierten d-LSD an die Gefäßwände o.ä. denkbar wäre, wurden Versuche mittels Gleichgewichtsdialyse durchgeführt, die ebenfalls eine Aktivierung der hochaffinen d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion durch Kalzium und Magnesium gegenüber Kontrollen ohne Salzzusatz zeigten. Auch der aktivierende Effekt des Magnesiumchlorids beruht auf der Erhöhung der apparenten Bindungsstellenkonzentration. Bindungskurven in Scatchard-Darstellung zeigen nach Auflösung in die Bindungsgeraden ebenfalls eine Parallelverschiebung dieser Geraden für die mittelaaffine Komponente. Für die hochaffine Bindungskomponente wurde in zwei Versuchen eine verstärkte Affinität zu d-LSD unter 10 mM MgCl festgestellt, jedoch sind die Messungen im Bereich niedriger [^3H]-d-LSD-Konzentrationen aus verschiedenen Gründen nur mit Vorbehalt zu interpretieren, weshalb die Verminderung der K_D als nicht signifikant betrachtet wurde.

Es wurde ferner versucht, Hinweise auf den Mechanismus der Magnesium-Aktivierung durch eine doppelt-reziproke Darstellung der Bindungsdaten zu erhalten (z.B. 35). Dabei zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Bindungsstellenkonzentration (vgl. Abb. 2), aber die Extrapolation beider Geraden schneidet die Abszisse auf dem identischen Abschnitt, entsprechend einer unveränderten Gleichgewichtskonstanten. Die Aktivierung der hochaffinen d-LSD-Bindungsstelle durch Magnesium wird also ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine Erhöhung der apparenten Konzentration der Bindungsstellen bedingt.

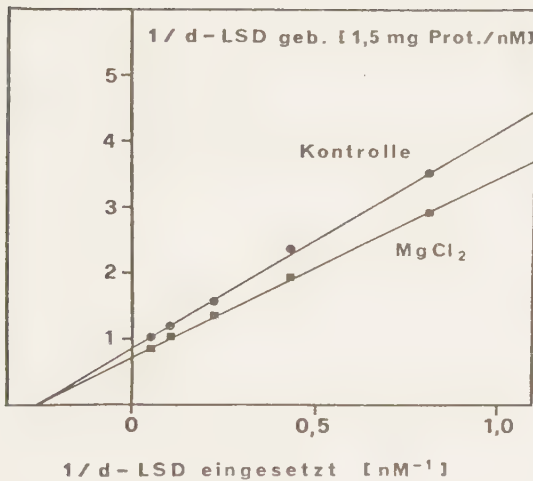


Abbildung 2: Doppeltreziproke Darstellung der [³H]-d-LSD-Bindung an die Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns: Kontrolle ohne Zusatz (●) und Proben mit Magnesiumchlorid (■) in einer Endkonzentration von 10 mM wurden entsprechend dem Standardverfahren inkubiert und über Glasfaserfilter filtriert. Die Endkonzentration an [³H]-d-LSD lag in dem dargestellten Bereich zwischen 1,2 und 19,3 nM und repräsentiert nur den Anteil der hochaffinen Bindungskomponente. 1,5 mg Protein pro Filter, Dreifachbestimmung.

3.1.2.2 Verminderte d-LSD-Bindung in Synaptosomalen Membranen des Rattengroßhirns unter Kalziumchlorid.

Auf die Darstellung einer Bindungskurve, die durch Zusatz von Kalziumchlorid um 20% der Kontrollbindung reduziert wurde, wurde in Anbetracht der ohnehin geringen d-LSD-Bindungskapazität der Synaptischen Membranfraktion (s. 3.1.5.) verzichtet. Der Hemmeffekt des Kalziumchlorids auf die d-LSD-Bindung in dieser Membranfraktion wurde allerdings mit der empfindlicheren Zerfallsmethode untersucht: Siehe dort.

3.1.3. Bindungsstudien mittels Ultrazentrifugation

Zum Ausschluß artifizieller Effekte bei der aktivierenden Wirkung des Kalziums und Magnesiums, die durch veränderte Adsorptionseigenschaften der Membranproteine an die Glasfaserfilter denkbar wären, wurde der Einfluß dieser Kationen auf die hochaffine [^3H]-d-LSD-Bindung mittels Ultrazentrifugation untersucht. Dabei konnte auch mit diesem Verfahren eine Aktivierung der hochaffinen [^3H]-d-LSD-Bindung durch Kalzium und Magnesium im Vergleich zur Kontrolle mit Kalium-Chlorid nachgewiesen werden. Die Meßwerte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Eine Scheinaktivierung durch veränderte Adsorption der Membranproteine an die Glasfaserfilter unter Kalzium und Magnesium kann somit ausgeschlossen werden.

Tabelle 2: Einfluß von Kationen auf die hochaffine [³H]-d-LSD-Bindung in der Gesamtembranfraktion des Rattengroßhirns: Bindungsstudie mittels Ultrazentrifugation

Kation [Konzentration]	Gesamtbindung IpM	unspezifische Bindung IpM	hochaffine Bindung IpM	Veränderung prozentual %
ohne	5466,4 ± 144,9	2419,3 ± 107,6	3047,1	± 0
Ca ²⁺ 10 mM	6014,7 ± 98,2	1591,7 ± 222,2	4423,0	+ 45,2 *
Mg ²⁺ 10 mM	5457,4 ± 244,5	1561,1 ± 55,3	3896,3	+ 27,9**
Na ⁺ 15 mM	5288,6 ± 512,6	2213,7 ± 123,5	3074,9	+ 0,9
K ⁺ 15 mM	5547,3 ± 554,2	2320,0 ± 52,9	3227,3	+ 5,9

Gesamtbindung bei 2 nM [³H]-d-LSD
Unspezifische Bindung bei 2 nM [³H]-d-LSD und 25 µM [¹H]-d-LSD

* p < 0,005

** p < 0,05

Dreifachbestimmung

Zur Durchführung vergleiche Text.

3.1.4. Hochaffine [^3H]-d-LSD-Bindung in der Fraktion schwerer mikrosomaler Membranen sowie Synaptischer Membranen: Darstellung nach Scatchard.

Zur Gewinnung der apparenten Gleichgewichtskonstanten der hochaffinen [^3H]-d-LSD-Bindung wurde die Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen an Membranpräparationen mikrosomaler Membranen sowie Synaptischer Membranen, gewonnen nach Jones und Matus (31) unter Gleichgewichtsbedingungen gemessen (vergleiche Abschnitt Materialien und Methoden). Es ergaben sich die in Abbildung 3 gezeigten Bindungskurven. In der Fraktion der mikrosomalen Membranen ergaben sich zwei Gleichgewichtskonstanten für [^3H]-d-LSD mit $K_{D1} = 1,9 \pm 0,4$ nM und einer Konzentration von $0,48 \pm 0,27$ pM/mg Protein sowie $K_{D2} = 21,3 \pm 8,1$ nM und einer Konzentration von $1,24 \pm 0,49$ pM/mg Protein. In der Fraktion Synaptischer Membranen lag nur eine uniforme hochaffine [^3H]-d-LSD-Bindungsstelle mit einer K_D von $2,5 \pm 0,2$ nM in einer Konzentration von $0,45 \pm 0,18$ pM/mg Protein vor. Die Werte für mikrosomale Membranen wurden dreifach bestimmt, die Werte bei den Synaptischen Membranen zweifach bestimmt. Die Werte für die mikrosomalen Membranen sind in guter Übereinstimmung mit den Gleichgewichtskonstanten, wie sie in einer früheren Arbeit in der Gesamtmembranfraktion mit einem Zentrifugationsverfahren (32) bestimmt worden waren. Bei diesem Zentrifugationsverfahren lag im Inkubationsansatz eine Endkonzentration von 10 mM Kalziumchlorid vor (32), so daß die gute Übereinstimmung der mit unterschied-

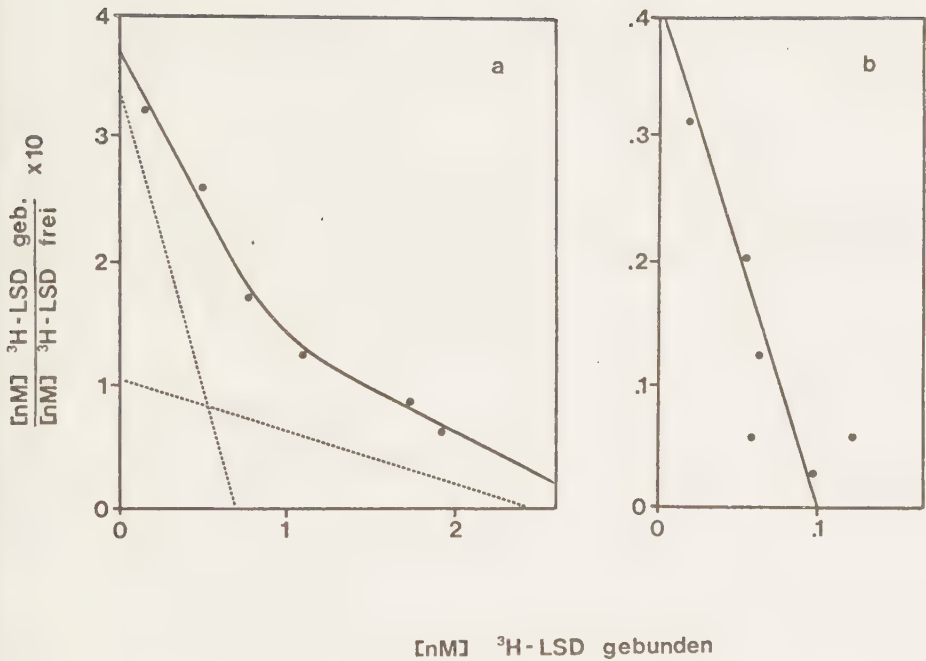


Abbildung 3: Hochaffine [3H]-d-LSD-Bindung in der Fraktion schwerer mikrosomaler Membranen und Synaptischer Membranen. a) Schwere mikrosomale Membranen b) Synaptische Membranen. Subzelluläre Fraktionen, gewonnen nach Jones und Matus (31) wurden dem Standardbindungstestverfahren mit [3H]-d-LSD unter Gleichgewichtsbedingungen unterzogen (vgl. Abschnitt Materialien und Methoden). Die Endkonzentrationen an radioaktiv markiertem LSD waren: 1,4,6,8,30 und 50 nM. Die Proteinkonzentrationen waren bei den schweren Mikrosomen 3,65 mg/ml und bei den Synaptischen Membranen 0,63 mg/ml. Dreifachbestimmung. Die graphische Darstellung ist das Ergebnis eines Experimentes. Die gestrichelten Linien in Abbildung a repräsentieren die 2 Bindungskomponenten, wie sie nach Rosenthal (60) ermittelt wurden.

lichen Methoden gewonnenen K_D wiederum bestätigt, daß Kalziumchlorid nicht die apparente K_D , sondern die apparente Konzentration der Bindungsstellen beeinflusst (vergleiche Abschnitt 3.1.3.).

3.2. Zur pharmakologischen Spezifität der [3 H]-d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion:

3.2.1. Verdrängungsstudium mit einer Auswahl unmarkierter Substanzen

Radioaktiv markierte Liganden können durch unmarkierte Liganden oder andere unmarkierte, strukturell verwandte Substanzen, von der Bindungsstelle verdrängt werden. Inkubiert man gleichzeitig radioaktiv markierten Liganden in konstanter Konzentration und konkurrierende unmarkierte Verbindung in steigender Konzentration, erhält man im Bindungstest eine Abnahme der gebundenen Radioaktivität (Abbildung 4). Diejenige Konzentration an unmarkiertem Agens, die die Bindung des radioaktiv markierten Liganden um die Hälfte der Kontrolle reduziert, wird als " IC_{50} " bezeichnet. Je niedriger diese "halbmaximale inhibitorische Konzentration" der verdrängenden Substanz ist, mit der die 50%ige Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden erreicht wird, umso höher ist die Affinität dieser Substanz zu der gemeinsamen Bindungsstelle.

Der Hill-Koeffizient ergibt sich aus der graphischen Darstellung der Bindungsdaten nach Hill (45,68), die nach der Gleichung $n \log L - \log K_D = \log \frac{\% \text{ Bindung}}{100\% - \% \text{ Bindung}}$ erfolgt.

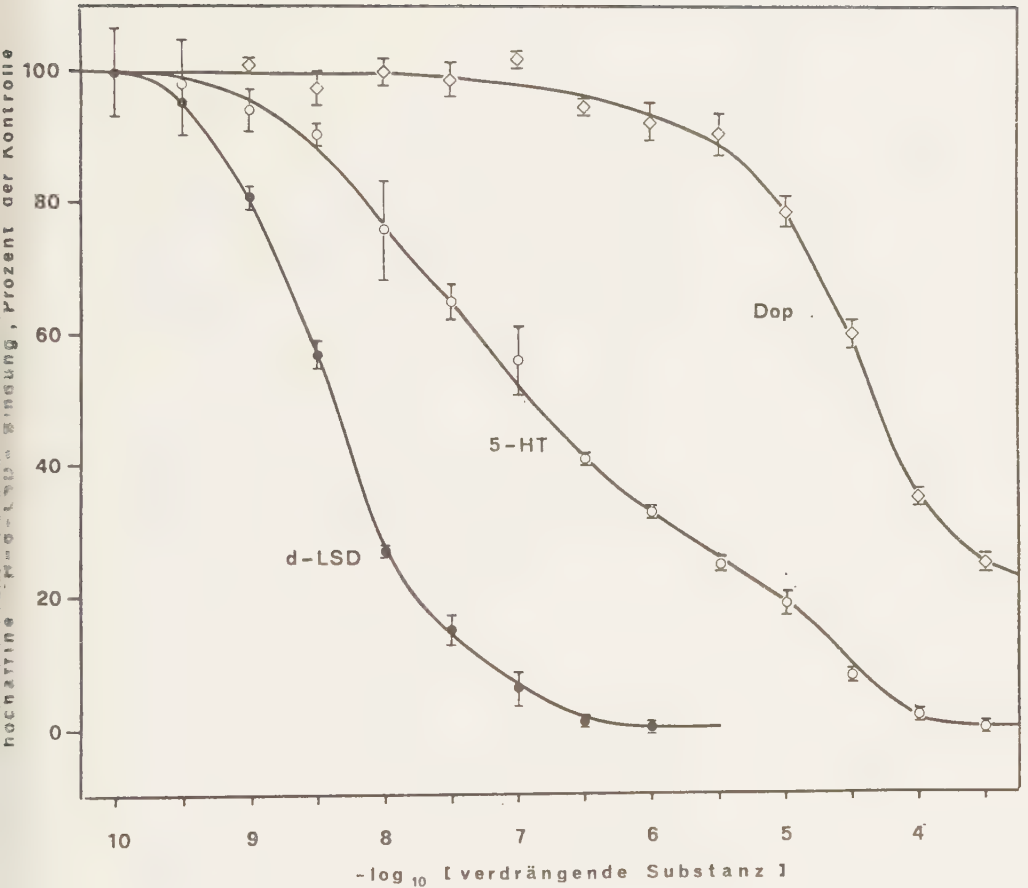


Abbildung 4: Verdrängungsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen zur Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von unmarkierten Substanzen gegenüber der hochaffinen $[^3H]$ -d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns. An den drei Beispielen der unmarkierten Substanzen d-LSD ($\bullet$), Serotonin (5-HT, $\circ$) und Dopamin (Dop, $\diamond$) werden typische Verdrängungskurven gezeigt. Radioaktiv markiertes $[^3H]$ -d-LSD in einer Endkonzentration von 2,0nM wurde simultan mit der unmarkierten Substanz in den in der Abszisse angegebenen Endkonzentrationen entsprechend dem Standard-Verfahren inkubiert und filtriert. Den Proben mit biogenen Aminen war der Monoaminoxidase-Hemmstoff Parpylin in einer Endkonzentration von 10 μ M zugesetzt. Die unspezifische $[^3H]$ -d-LSD-Bindung wurde in Anwesenheit von 2,0 μ M (Endkonzentration) unmarkierten d-LSD gemessen und subtrahiert. Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Hill-Koeffizienten um 1 weisen auf eine kompetitive Interaktion zwischen Bindungsstelle, Ligand und verdrängender Substanz hin (68), Hill-Koeffizienten kleiner als 1 können durch negative Kooperativität, aber auch durch andere Mechanismen (siehe Diskussion) erklärt werden. Der Hill-Koeffizient wurde früher auch als identisch mit der Zahl der Bindungsstellen pro Rezeptormolekül interpretiert (45) (siehe Diskussion). Der Hill-Koeffizient wurde in dieser Arbeit aufgrund theoretischer Überlegungen, die im Abschnitt "Diskussion" dargelegt sind, als Funktion der Konzentration und somit also variabel über den gesamten Konzentrationsbereich der eingesetzten Verbindung, betrachtet.

In vorliegender Arbeit wurde in der graphischen Darstellung der Bindungsdaten nicht wie im Original der Hill-Darstellung der Prozentsatz der Bindung, sondern der Prozentsatz der Hemmung eingesetzt, wobei die sich dabei ergebenden Regressionskoeffizienten streng genommen nicht als Hill-Koeffizienten bezeichnet werden dürfen. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (2,48) werden diese so gewonnenen Steigungen hier jedoch ebenfalls als Hill-Koeffizient bezeichnet und zur Unterscheidung zu den originalen Hill-Koeffizienten in Parenthese gesetzt. Dabei ist die oben gegebene Interpretation dieser Steigungen ebenfalls zu invertieren: Ein Zahlenwert größer 1 für diese Regressions-Koeffizienten würde auf negative Kooperativität hinweisen, weil das Gleichgewicht der Bindung des radioaktiv markierten Liganden unverhältnismäßig stark zur Seite der Dissoziation hin verschoben wird.

Umgekehrt deuten Koeffizienten kleiner als 1 auf Kooperativität hin.

Zur experimentiellen Durchführung vgl. Abschnitt "Materialien und Methoden" (2.2.1.).

Ergebnis: In Tabelle 3 sind die IC_{50} -Werte, die "Hill-Koeffizienten" und die Inhibitor konstante K_I , berechnet nach

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + [^3H-d-LSD]/K_D} \quad (6) \text{ unter Zugrundelegung einer } K_D \text{ ge-}$$

genüber d-LSD von 1,6 nM zusammengefaßt.

In vorliegender Versuchsreihe (Abb. 4 und Abb. 5) zeigte unmarkiertes d-LSD einen "Hill-Koeffizienten" von 1,01 über den gesamten untersuchten Bereich von 0,3 nM bis 100 nM. Dieses Verhalten deutet auf eine rein kompetitive Wechselwirkung des d-LSD mit seinen Bindungsstellen hin.

Weitere Substanzen, die [3H]-d-LSD mit einem "Hill-Koeffizienten" von nahezu 1, somit also kompetitiv von den Bindungsstellen verdrängten, war das nicht halluzinogene Lysergsäure-Derivat Brom-LSD (BOL) ($m=1,01$) und Tryptamin ($m=1,06$), wenn man den "Hill-Koeffizienten" über den gesamten Konzentrationsbereich berechnet.

Ein interessantes Verhalten zeigt die Interaktion des Serotonins mit den d-LSD-Bindungsstellen (Abb. 4 und Abb. 5). Berechnet man mittels linearer Regression den "Hill-Koeffizienten" über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,3 nM bis 100 μ M Serotonin, so ergibt sich ein Wert von $m=0,53$, was auf einen kooperativen Effekt des Serotonins auf die d-LSD-Bindungsproteine in der Gesamtmembranfraktion hindeuten würde.

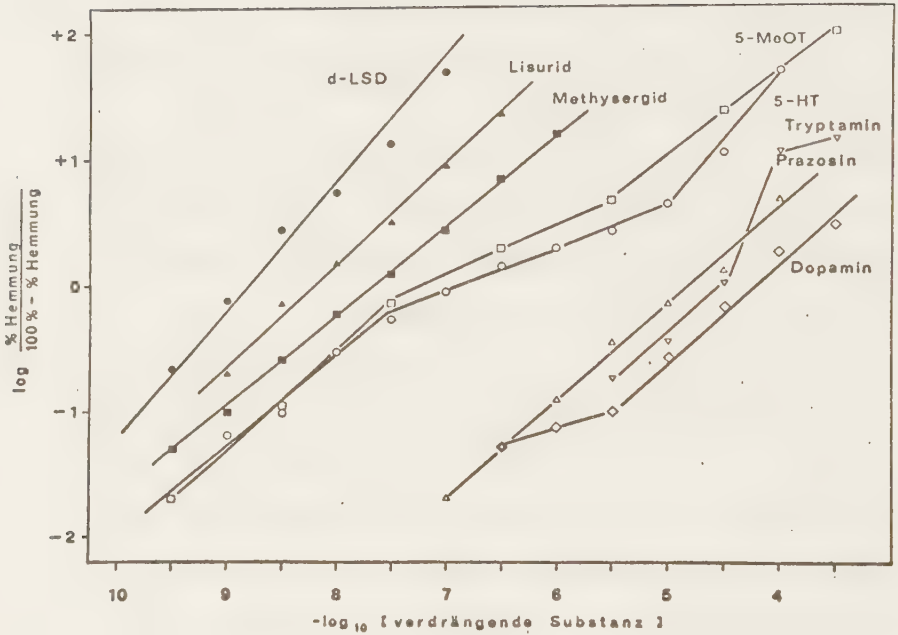


Abbildung 5: Darstellung der Daten aus den Verdrängungsexperimenten nach Hill zur Bestimmung des "Hill-Koeffizienten". Zur Durchführung vergl. Legende der Abb. 4. Die Berechnung der Kurvenpunkte erfolgte nach

$$y = \log \frac{\% \text{ Hemmung}}{100\% - \% \text{ Hemmung}} \quad . \text{ Dreifachbestimmung.}$$

5-MEOT: 5-Methoxytryptamin.

Tabelle 3: Halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC_{50}), Hill-Koeffizienten und Inhibitor-konstanten K_i verschiedener Substanzen gegenüber [3H]-d-LSD in der Gesamt-membranfraktion des Rattengroßhirns.

	IC_{50} (M/L)	K_i (M/L)	"Hill- Koeffizient"	r^2
d-LSD	$4,0 \times 10^{-9}$	$1,73 \times 10^{-9}$	1,01	0,98 (7)
Lisurid	$5,6 \times 10^{-9}$	$2,42 \times 10^{-9}$	0,80	0,99 (6)
BOL (Pg)	$16,1 \times 10^{-9}$	$6,96 \times 10^{-9}$	1,01	0,99 (7)
Methergolin	$18,0 \times 10^{-9}$	$7,78 \times 10^{-9}$	0,55	0,99 (6)
Methysergid (Pg)	$22,4 \times 10^{-9}$	$9,69 \times 10^{-9}$	0,65	0,99 (10)
5-MEOT (Pg)	$63,1 \times 10^{-9}$	$27,29 \times 10^{-9}$	0,58	0,98 (7)
5-MEO-N,N-DMT (Pg)	$72,4 \times 10^{-9}$	$31,31 \times 10^{-9}$	0,51	0,99 (8)
Serotonin (Pg)	$160,0 \times 10^{-9}$	$69,19 \times 10^{-9}$	0,53	0,97 (12)
Bufotenin (Pg)	$160,0 \times 10^{-9}$	$69,19 \times 10^{-9}$	0,56	0,99 (10)
Tryptamin (Pg)	$30,0 \times 10^{-6}$	$12,97 \times 10^{-6}$	1,06	0,94 (5)
Dopamin (Pg)	$50,0 \times 10^{-6}$	$21,62 \times 10^{-6}$	----	----
Oxymetazolidin	$16,0 \times 10^{-9}$	$6,92 \times 10^{-9}$	0,45	0,96 (9)
Cyproheptadin	$158,5 \times 10^{-9}$	$\times 10^{-9}$	0,65	0,99 (5)
Phenoxybenzamin	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,32 \times 10^{-6}$	0,70	0,99 (8)
Apomorphin	$1,1 \times 10^{-6}$	$4,75 \times 10^{-6}$	1,52	1,00 (4)
Prazosin	$14,0 \times 10^{-6}$	$6,05 \times 10^{-6}$	0,77	0,99 (7)
Ketamin	$20,0 \times 10^{-3}$	$8,65 \times 10^{-3}$	----	----

Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen und Hillkoeffizienten wurden wie in Abb. 4 und 5 dargestellt bei einer [3H]-d-LSD-Endkonzentration von 2,0 nM ermittelt (1,5 mg Protein pro Filter). Das Bestimmtheitsmaß r^2 wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet, wobei die in Klammern angegebene Anzahl von Kurvenpunkten berücksichtigt wurde. Dreifachbestimmung der einzelnen Meßpunkte. Pg bedeutet Pargylin in einer Endkonzentration von $10,0 \mu M$, K_i berechnet nach $K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [^3H\text{-d-LSD}]/K_D}$.

Tabelle 3 a): Halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC₅₀), "Hill-Koeffizienten" und Inhibitor-konstanten K_i verschiedener Substanzen gegenüber [³H]-d-LSD in der Gesamt-membranfraktion des Rattengroßhirns.

	"Hill-Koeff." r ²	diskontinuierlicher "Hill-Koeffizient" mit/r ² für drei Teilbereiche
d-LSD	1,01 0,98 (7)	-----
Lisurid	0,80 0,99 (6)	-----
BOL (Pg)	1,01 0,99 (7)	-----
Methergolin	0,55 0,99 (6)	-----
Methysergid (Pg)	0,65 0,99 (10)	-----
5-MEOT (Pg)	0,58 0,98 (7)	0,79/1,00 (3)
5-MEO-N,N-DMT (Pg)	0,51 0,99 (8)	-----
Serotonin (Pg)	0,53 0,97 (12)	0,64/0,98 (5)
Bufotenin (Pg)	0,56 0,99 (10)	-----
Tryptamin (Pg)	1,06 0,94 (5)	0,75/0,99 (3)
Dopamin (Pg)	-----	0,28/0,95 (3)
Oxymetazolidin	0,45 0,96 (9)	0,79/0,99 (4)
Cyproheptadin	0,65 0,99 (5)	-----
Phenoxybenzamin	0,70 0,99 (8)	0,53/1,00 (4)
Apomorphin	1,52 1,00 (4)	-----
Prazosin	0,77 0,99 (7)	-----
Ketamin	-----	-----

Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen und Hillkoeffizienten wurden wie in Abb. 4 und 5 dargestellt bei einer [³H]-d-LSD-Endkonzentration von 2,0 nM ermittelt (1,5 mg Protein pro Filter). Das Bestimmtheitsmaß r² wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet, wobei die in Klammern angegebene Anzahl von Kurvenpunkten berücksichtigt wurde. Dreifachbestimmung der einzelnen Meßpunkte. Pg bedeutet Pargylin in einer Endkonzentration

von 10,0 µM, K_i berechnet nach $K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [^3H\text{-d-LSD}]/K_D}$

Das Bestimmtheitsmaß dieser Korrelation beträgt allerdings nur $r^2 = 0,97^*$ als Ausdruck der relativ großen Abweichung der Meßwerte von der Regressionsgeraden. Versucht man nun, das Bestimmtheitsmaß r^2 durch Unterteilung der Regressionsgeraden in Einzelabschnitte zu optimieren, so erhält man im Bereich von 0,3 nM bis 30 nM Serotonin einen "Hill-Koeffizienten" m von 0,64 mit $r^2 = 0,98$ bei 5 Kurvenpunkten, im Bereich von 100 nM bis 10 μ M ein $m = 0,32$ mit $r^2 = 1$ bei 2 Kurvenpunkten und im Bereich von 10 μ M bis 100 μ M ein m von 1,06 mit $r^2 = 0,99$ bei 3 Kurvenpunkten. Im Verlauf zunehmender Serotoninkonzentration ändert sich also der Mechanismus der Wechselwirkung des Serotonins mit den d-LSD-Bindungsproteinen von anfänglicher Kooperativität bei niedrigen Serotoninkonzentrationen über den mittleren Konzentrationsbereich, der einen noch stärkeren kooperativen Effekt hat, bis hin zur rein kompetitiven Wechselwirkung bei hohen Serotoninkonzentrationen.

Ein fast identisches Wechselwirkungsmuster mit den d-LSD-Bindungsstellen hat das 5-Methoxytryptamin (5-MEOT). In den gleichen Konzentrationsbereichen wie bei Serotonin verändert sich der "Hill-Koeffizient" von 0,79 über 0,34 bis 0,73, so daß zum Unterschied zu Serotonin bei hohen Konzentrationen 5-Methoxytryptamin weiter Kooperativität und keine rein kompetitive Wechselwirkung zu bestehen scheint.

* Das Bestimmtheitsmaß r^2 wurde nach

$$r^2 = \frac{[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}]^2}{[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}][\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}]}$$

berechnet und ist nicht

identisch mit dem Korrelationskoeffizienten r .

Eine Sonderstellung nimmt das Tryptamin ein, dessen über den gesamten Konzentrationsbereich berechneter "Hill-Koeffizient", wie oben beschrieben, bei $m=1,06$ liegt, wobei das Bestimmtheitsmaß aufgrund größerer Abweichungen von der Regressionsgeraden nur bei $r^2 = 0,94$ liegt. Nach Optimierung von r^2 durch Auflösen in Teilbereiche erhält man $m = 0,75$ ($r^2 = 0,99$) für den Bereich 3-30 μM , dann erfolgt ein Sprung mit $m = 2,06$ von 30 - 100 μM und schließlich wieder $m = 0,26$ im hohen Konzentrationsbereich von 100 - 300 μM . Es könnte also Tryptamin in einer Konzentration von 30 - 100 μM einen negativ kooperativen Effekt auf die d-LSD-Bindung ausüben (vgl. die kinetischen Untersuchungen in Abschnitt 5).

Alle anderen getesteten Substanzen üben nach den "Hill-Koeffizienten" zu schließen einen mehr oder weniger starken kooperativen Effekt auf die hochaffine d-LSD-Bindung aus. Eine Ausnahme bildet lediglich Apomorphin, das über fast den gesamten Bereich, in dem es d-LSD von den Bindungsstellen verdrängt, einen "Hill-Koeffizienten" von 1,52 ($r^2 = 1,00$ bei 4 Punkten) aufweist. Im höheren Konzentrationsbereich ab etwa 1 μM fällt m auf unter Eins ab. Dabei hat Apomorphin noch die Besonderheit, daß es die hochaffine d-LSD-Bindung bis zu einer Konzentration von 3 nM um etwa 5 Prozent der Kontrolle ohne Apomorphin aktiviert. Ein fast identisches Kurvenbild zeigt Prazosin: Die hochaffine d-LSD-Bindung wird hier ebenfalls stetig bis zu einer Konzentration von 3 nM Prazosin um sogar 11 Prozent der Kontrolle aktiviert. Dann setzt die Verdrängung von d-LSD mit $m = 0,77$ ($r^2 = 0,99$) ein.

Die Zunahme der hochaffinen d-LSD-Bindung bei Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen von Apomorphin und Prazosin deuten ebenfalls auf eine Kooperativität hin. Im Falle des Apomorphins, das als Agonist des praesynaptischen Dopamin-Rezeptors bekannt ist (9), könnte sich diese Aktivierung am Dopamin-Rezeptor abspielen.

3.2.2. Kinetische Untersuchungen:

3.2.2.1 Experimente mit dem Zerfall der im Gleichgewicht stehenden [^3H]-d-LSD-Bindungsprotein-Komplexe, induziert durch unmarkiertes d-LSD: Isotopenverdünnungsmethode.

Es sollte versucht werden, eine Differenzierung der in der Gesamt-Membranfraktion des Rattengroßhirns vorhandenen d-LSD-Bindungsproteine mittels möglicherweise vorhandener pharmakologischer Präferenzen dieser einzelnen Rezeptortypen möglich zu machen. Die zugrundeliegende Idee war, mittels verschiedener Pharmaka und Substanzen, von denen bekannt war, daß sie d-LSD-, Serotonin- oder Dopamin-Rezeptoren besetzen, zunächst die d-LSD-Bindungsstellen in der gesamten Membranfraktion in Konkurrenz zu markiertem d-LSD mehr oder weniger abzusättigen. Falls eine hinreichende Selektivität dieser benutzten Substanzen zu ihren spezifischen Rezeptoren besteht, sollten diese Bindungsstellen, zu denen diese pharmakologische Spezifität besteht, bevorzugt, weil mit höherer Affinität besetzt werden. Nach Gleichgewichtseinstellung wird dann durch Zugabe einer hohen Konzentration von unmarkiertem d-LSD die Dissoziation des gebundenen markierten d-LSD's eingeleitet. Aus der freigesetz-

ten Menge des radioaktiven d-LSD's von den einzelnen Bindungsstellentypen sollten dann Rückschlüsse auf die bevorzugte Besetzung dieser Bindungsstellenpopulationen durch die benutzten Pharmaka möglich sein.

Ein Beispiel: Die d-LSD-Bindungsstellen, die mit dem Serotoninrezeptor identisch sind, sollten eine höhere Affinität zu Serotonin oder möglicherweise einem anderen spezifischen Agonisten oder Antagonisten haben, als zu den anderen Bindungsstellen, die zwar auch durch d-LSD besetzt werden, nicht aber mit dem Serotoninrezeptor identisch sind. Diese Eigenschaft eines Rezeptors wird auch in einer neueren Arbeit an die erste Stelle der Rangfolge der Kriterien zur Definition des Rezeptorbegriffs gestellt (36). Das würde bedeuten, daß in unserem Beispiel bei gleichzeitiger Inkubation der Membranpräparation mit [^3H]-d-LSD und Serotonin dieses in Konkurrenz zu d-LSD bevorzugt den Serotoninrezeptor statt den Dopamin- oder Tryptaminrezeptor besetzen würde, was sich durch die reduzierte [^3H]-d-LSD-Bindung dieser Serotoninrezeptoren messen ließe. Dadurch wäre eine Identifizierung des Serotoninrezeptors möglich. Bezogen auf das Zerfallsexperiment bedeutet das, daß die nach der Inkubation freisetzbare Menge an [^3H]-d-LSD von den einzelnen Bindungskomponenten unterschiedlich vermindert werden sollte, je nach dem Ausmaß der Besetzung der Bindungsstellen durch die gleichzeitig vorhandenen unmarkierten Substanzen. Der ideale Extremfall wäre die vollständige Besetzung eines Typs von d-LSD-Bindungsstellen durch eine Verbindung mit hundert-

prozentiger Spezifität zu diesem Bindungsstellentyp. Im Zerfallsversuch würde daraus ein vollständiger Wegfall der betreffenden Zerfallskomponente resultieren. Leider sind aber solche Pharmaka mit hundertprozentiger Rezeptorspezifität nicht bekannt und auch aus theoretischen Überlegungen heraus wahrscheinlich nicht möglich. Es gibt jedoch den speziellen Fall der irreversiblen Blockade der Bindungsstellen, der mit der gleichen Zielsetzung eingesetzt werden kann (siehe unten).

Zur experimentiellen Durchführung vergleiche Abschnitt "Materialien und Methoden (2.2.2)", sie soll hier nur kurz beschrieben werden: d-LSD-Bindungsproteine in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns wurden simultan mit tritiummarkiertem d-LSD und konkurrierendem Pharmakon, meist in IC_{50} -Konzentration, inkubiert. Nach Gleichgewichtseinstellung wurde der Zerfall der [3H]-d-LSD-Bindungsprotein-Komplexe durch Zugabe von unmarkiertem d-LSD eingeleitet. Der Zerfall wurde messend verfolgt durch Entnahme von Aliquoten aus dem Inkubationsansatz, die dann entsprechend dem Standardbindungstestverfahren abfiltriert wurden. Das unmarkierte LSD wurde hochkonzentriert in einer kleinen Menge von 120 μ l einer 1,2 mM-Lösung dem Testansatz zupipettiert, so daß Volumenverdünnungseffekte zu vernachlässigen waren. Die Endkonzentration des unmarkierten d-LSD während des Zerfalls war also bei einer Gesamtmenge von 12 ml Proteinsuspension etwa 12 μ M.

In den Inkubationsansätzen mit Aminen wurde der Monoaminoxidasehemmstoff Pargylin in einer Endkonzentration von 10 μ M

zugesetzt, um die Amine während der Inkubation vor dem Abbau zu schützen. Da Pargylin selbst die d-LSD-Bindung reduziert, wurden für Zerfälle mit Pargylin eigene Kontrollen, ohne Amin, aber mit Pargylin, durchgeführt.

Die so gemessenen Zerfallskurven wurden durch Subtraktion eines empirisch gewonnenen Wertes, der den langsam zerfallenden, bzw. irreversiblen Anteil der unspezifischen Bindung repräsentiert, korrigiert (siehe Abschnitt 3.2.2.1.1).

3.2.2.1.1 Das Problem der unspezifischen Bindung in den Zerfallsexperimenten.

Der Ausdruck "unspezifische Bindung" bedeutet Bindung des Liganden mit einer geringen Affinität an unspezifische - nicht mit Rezeptorstellen identischen Bindungs-Proteinstrukturen durch Adsorption, elektrostatische Wechselwirkungen mit geladenen Aminosäureseitenketten der Proteine oder auch hydrophoben Wechselwirkungen usw. Unspezifische Bindung ist gekennzeichnet durch eine hohe Dissoziationskonstante und wird im Bindungstest unter Gleichgewichtsbedingungen durch Zusatz von einem hohen Überschuß an unmarkiertem Liganden gemessen. Man rechnet dabei einen tausendfachen Überschuß des unmarkierten zum markierten Liganden (68), in vorliegender Arbeit wurde die unspezifische Bindung bei 2 nM [^3H]-d-LSD mit 2-3 μM unmarkiertem d-LSD gemessen. Bei Zerfallsexperimenten ist jedoch zu berücksichtigen, daß bei Zusatz des unmarkierten Liganden bei der Einleitung des Zerfalls der unspezifisch gebundene Ligand wegen seiner nur lockeren Assoziation mit dem Protein sehr rasch abdissoziiert. Tatsächlich ergibt sich bei den Zer-

fallsversuchen ein initialer Abfall der Bindung zwischen der Kontrolle vor Einleitung des Zerfalls und der Zeit "Null", die unmittelbar nach Zupipettieren des verdrängenden d-LSD's und Schütteln auf dem Vortex-Schüttler entnommen wurde. Diese Zeitspanne betrug maximal 15 Sek., und in dieser Zeit nahm die Bindung um zwischen 10 und 20 Prozent der Gesamtbindung ab. Es wurden Versuche durchgeführt, um das Verhalten der unspezifischen Bindung beim Zerfall aufzuklären. Dabei wurde deutlich, daß sich die unspezifische Bindung im Zerfall aus dem initialen, sehr raschen Abfall und aus einer faktisch irreversiblen Bindung zusammensetzt. Entsprechende Versuche wurden einmal mit einer "Quench"-Inkubation bei Anwesenheit von 2 μM unmarkiertem d-LSD, zum anderen mit einer denaturierten Gesamtmembranfraktion, die keine intakten Rezeptorstellen mehr enthält (32) durchgeführt. Als Konsequenz wurden die Zerfallskurven mit einem berechneten Wert aus dem gemessenen Wert für die unspezifische Bindung abzüglich der raschen Zerfallskomponente aus der Differenz der Bindungswerte zwischen "vorher" und Zeit "Null" korrigiert. Dieses Verfahren erschien den tatsächlichen Bedingungen am besten gerecht zu werden, obgleich dadurch gewisse Ungenauigkeiten in die Berechnung der Halbwertszeiten eingehen können. Solch eine Überkorrektur liefert in der graphischen Darstellung eine konvexe Abweichung der Zerfallskurve von der Geraden.

Bei den Zerfällen in der Volumenverdünnungsmethode, bei der der Zerfall der im Gleichgewicht stehenden [^3H]-d-LSD-

Bindungsprotein-Komplexen nicht durch einen Überschuß an unmarkiertem d-LSD, sondern durch Verdünnung des Inkubationsansatzes mit Pufferlösung erzielt wird, mußte zusätzlich die "Restbindung" berücksichtigt werden. Diese Restbindung entspricht der [^3H]-d-LSD-Bindung bei der nach der Verdünnung des Inkubationsansatzes noch vorliegenden Endkonzentration. Wenn der Inkubationsansatz also 2 nM an [^3H]-d-LSD war, beträgt die Endkonzentration an markiertem d-LSD nach 20-facher Verdünnung etwa 0,1 nM [^3H]-d-LSD. Aus einer extrapolierten Bindungskurve entnimmt man den Wert der Bindung bei 0,1 nM [^3H]-d-LSD und korrigiert damit die Zerfallskurven.

2.2.1.2 Ergebnisse der Zerfallsversuche:

Die Dissoziation der [^3H]-d-LSD-Bindungsprotein-Komplexe folgt der Kinetik einer Reaktion 1. Ordnung, was bedeutet, daß die gebundene Radioaktivität beim Zerfall nach der Funktion $y = e^{-k \cdot t}$ abnimmt (57). Die Abbildung 6 zeigt Beispiele von Zerfallskinetiken in halblogarithmischer Darstellung. Wie man sieht, setzt sich der Zerfall aus zwei Komponenten mit unterschiedlicher Halbwertszeit T zusammen. Aus den Halbwertszeiten lassen sich für Reaktionen der 1. Ordnung die Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} des Zerfalls nach der Gleichung $k = \frac{\ln 2}{T}$ (57) berechnen. Die schnelle Komponente des Zerfalls wurde durch Subtraktion der sich überlagernden langsamen Komponente korrigiert.

Dazu wurde die dem langsamen Zerfall entsprechende Gerade bis zur Zeit Null extrapoliert und die Differenz zwischen

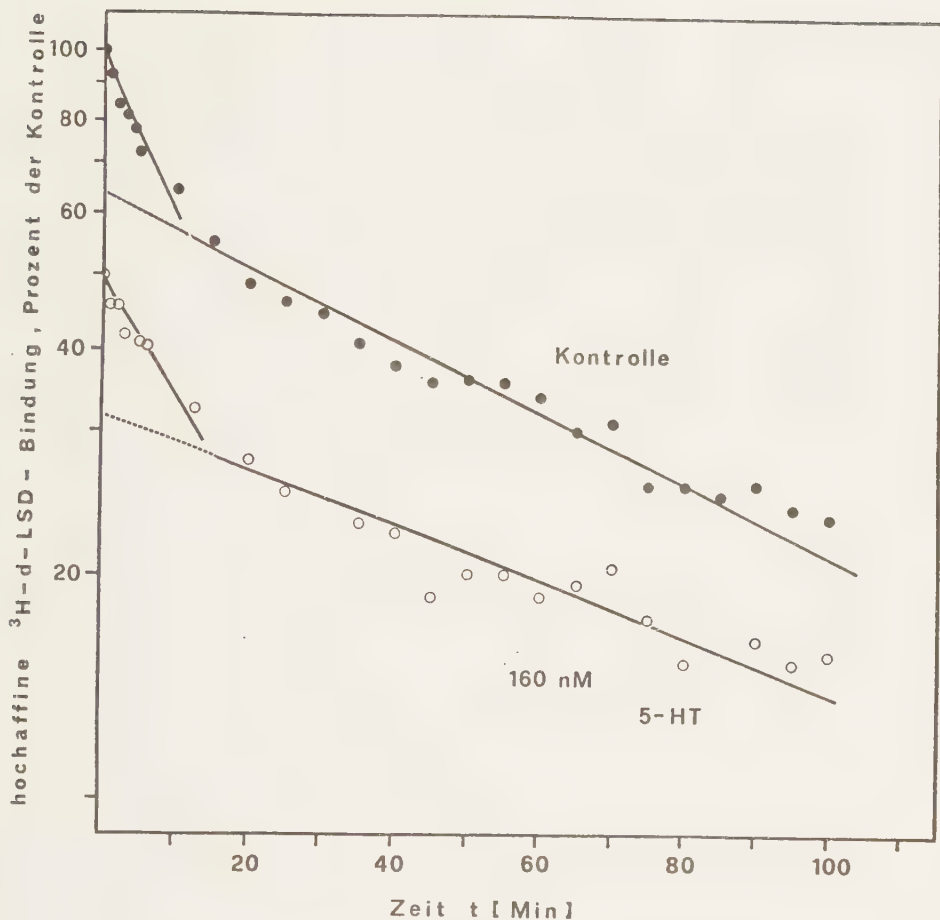


Abbildung 6: Kinetik des Zerfalls der hochaffinen [³H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe nach Zusatz von unmarkiertem d-LSD: Isotopenverdünnungsmethode. Es wurden jeweils 12 ml Proteinsuspension (in 25 mM Tris/HCl, pH 7,4, Proteinkonzentration 3mg/ml) mit einer Endkonzentration von 2,0nM [³H]-d-LSD entsprechend den Standardbedingungen inkubiert. Simultan wurden unmarkierte verdrängende Substanzen, im obigen Beispiel Serotonin (5-HT) in eine Endkonzentration von 160nM mitinkubiert. Nach Ablauf der Inkubation (90Min. bei 25°C) wurden jedem Ansatz 120µl einer hochkonzentrierten Lösung von unmarkiertem d-LSD (1,2mM in 25mM Tris/HCl, pH 7,4) zupipettiert und die Dissoziation der unmarkierten Bindungsproteinkomplexe nach raschem Schütteln durch Entnahme von jeweils 500µl und Abfiltrieren dieser Aliquote zu den angegebenen Zeiten entsprechend dem Standardverfahren gemessen. Korrektur der Meßwerte durch Subtraktion des irreversiblen Anteils der unspezifischen Bindung (vergl. Abschn. 3.2.2.1.1.). Die schnell zerfallende Komponente ergibt sich aus der Differenz der Extrapolation der langsamen Zerfallskomponente (gestrichelt) vom Gesamt-Zerfall (initialer Kurvenanteil). Einfachbestimmung.

extrapolierter und gemessener Zerfallsgeraden graphisch dargestellt. Die resultierende Gerade repräsentiert dann die korrigierte schnelle Zerfallskomponente. Die Zulässigkeit dieses Verfahrens kann man anhand einer Modellrechnung leicht nachprüfen, und in analoger Weise wurde auch von anderen Autoren (16,38) in späteren Arbeiten verfahren. Eine theoretische Bearbeitung dieser Auflösungsmethode findet sich bei (62). Für den Zerfall der [^3H]-d-LSD-Bindungsproteine ergaben sich die zwei Halbwertszeiten bzw. Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} von $T_1 = 6,1 \pm 6,8$ Min. ($1,89 \times 10^{-3}$ sec. $^{-1}$) und $T_2 = 51,8 \pm 4,6$ Min. ($2,23 \times 10^{-4}$ sec. $^{-1}$). Die Halbwertszeiten der Kontrollen mit Pargylin sind nicht signifikant verschieden, jedoch wird die Menge an gebundenem [^3H]-d-LSD durch Pargylin reduziert. Wie einleitend dargelegt wurde, sollte durch Besetzung der Bindungsstellen mit verdrängenden Substanzen deren möglicherweise vorhandenen Präferenzen gegenüber den verschiedenen Bindungsstellen nachgewiesen werden. Dazu wurde der Inkubationsansatz mit einer der IC_{50} entsprechenden Endkonzentration des Inhibitors wie im Standardverfahren inkubiert. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigt Tabelle 4. Die Signifikanzen wurden nach dem t-Test berechnet. Zusammengefaßt zeigt die Tabelle 4, daß nur wenige Substanzen eine mit ausreichender Signifikanz nachzuweisende Selektivität für die beiden Typen von d-LSD-Bindungsstellen aufweisen. Diese Substanzen sind bei den Aminen das Dopamin und das 5-Methoxytryptamin, die beide bevorzugt die schnelle Zerfallskomponente besetzen und das Tryptamin, das bevorzugt die langsame Komponente der d-LSD-Bindungsproteine besetzt. Serotonin scheint zwar wie Dopamin

Tabelle 4: Dissoziation der hochaffinen [^3H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe in der Gesamtembranfraktion des Rattengroßhirns nach halbmaximaler Besetzung der d-LSD-Bindungsstellen mit ummarkierten verdünngenden Substanzen durch Zusatz von ummarkiertem d-LSD: Isotopenverdünnungsmethode, 25°C. Hochaffine [^3H]-d-LSD-Bindung in IpM. (Pg: Pargylin 10µM). Freisetzung der Radioaktivität von Komponente A und B+C, die hier als einheitliche Komponente erscheint. Signifikanz nach dem t-Test gegen die Kontrolle mit oder ohne Pargylin berechnet, bei den freigesetzten IpM gegen 50% der gemessenen freigesetzten IpM der Kontrollen.

Zusatz (Konzentration)	Halbwertszeiten (Min.)	freigesetztes [^3H]-d-LSD (IpM)
d-LSD-Kontrolle (ohne Zusatz)	ohne Pg 6,1 ± 0,6 (3) 51,8 ± 4,6 (3)	222,0 ± 35,5 (3) 486,3 ± 13,6 (3)
d-LSD-Kontrolle (ohne Zusatz)	mit Pg 5,1 ± 0,9 (4) ns 57,0 ± 5,6 (4) ns	113,3 ± 23,2 (4) 335,8 ± 23,3 (4)
d-LSD (6 nM)	ohne Pg 5,9 ± 1,3 (3) ns 75,8 ± 7,4 (3) 0,005	119,1 ± 21,7 (3) ns 235,1 ± 21,7 (3) 0,005
5-HT (160 nM)	mit Pg 5,0 ± 1,4 (5) ns 83,7 ± 6,3 (5) 0,0005	50,6 ± 5,0 (4) ns 169,5 ± 5,2 (4) ns
Dopamin (500 µM)	mit Pg 4,3 ± 0,8 (5) ns 89,4 ± 2,7 (5) 0,0005	40,8 ± 7,2 (4) 0,05 184,1 ± 7,1 (4) 0,05
Tryptamin (40 µM)	mit Pg 5,7 ± 1,5 (3) ns 127,2 ± 24,3 (3) 0,005	78,6 ± 13,6 (3) 0,05 146,1 ± 11,1 (3) 0,05
5-MEOT (63 nM)	mit Pg 3,2 ± 0,7 (6) 0,05 91,0 ± 12,1 (6) 0,005	44,4 ± 6,5 (6) 0,05 181,0 ± 6,6 (6) 0,05
Methergolin (6 nM)	ohne Pg 6,3 ± 2,1 (3) ns 59,3 ± 17,3 (3) ns	114,5 ± 10,4 (3) ns 239,2 ± 19,2 (3) ns
Lisurid (6 nM)	ohne Pg 6,3 ± 1,9 (3) ns 139,0 ± 10,5 (3) 0,0005	73,4 ± 19,1 (3) 0,05 281,6 ± 16,5 (3) 0,01
Cyproheptadin (160 nM)	mit Pg 3,7 ± 1,0 (4) 0,05 36,5 ± 4,4 (4) 0,001	69,1 ± 15,4 (4) ns 158,5 ± 12,0 (4) ns
	ohne Pg 6,2 ± 0,8 (3) ns 61,7 ± 6,3 (3) 0,05	86,3 ± 17,7 (3) ns 268,0 ± 1,8 (3) 0,005

und 5-Methoxytryptamin bevorzugt die schnelle Zerfallskomponente zu besetzen, jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Bei den Pharmaka, die mit der d-LSD-Bindung interferieren, besetzt Lisurid als Dopamin - Agonist (17) und Agonist des präsynaptischen Serotonin-Autorezeptors (59) bevorzugt die schnelle Zerfallskomponente ebenso wie der Serotonin-Antagonist Cyproheptadin (28,51,66) allerdings nur in Abwesenheit von Pargylin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die schnelle d-LSD-Zerfallskomponente wahrscheinlich hauptsächlich durch serotonerge und dopaminerge Rezeptoren verursacht wird. Serotonin und Dopamin besetzen allerdings auch teilweise die langsame Zerfallskomponente. Dies ist darauf zurückzuführen, daß einmal die Serotonin- und Dopamin-Rezeptoren heterogen sind (2,9,15,20,33,51,54,55,56,59,66) und daß zum anderen beide Amine keine hundertprozentige Spezifität für ausschließlich "ihre" Rezeptoren aufweisen.

3.2.2.1.3 Die Halbwertszeiten im Zerfallsversuch:

Bei Reaktionen 1. Ordnung ist die Halbwertszeit unabhängig von der Substratkonzentration (57). Dies gilt auch in der Praxis, wenn man in einem Modell die Halbwertszeiten nach halbmaximaler Besetzung der Bindungsstellen berechnet. Werden also die Halbwertszeiten bei einer Reaktion 1. Ordnung bei teilweiser Besetzung der Bindungsstellen durch eine Substanz im Vergleich zur Kontrolle verändert, muß dieser Effekt als verursacht durch diese zusätzlich vorhandene Substanz betrachtet werden. Bei den in der Tabelle 4 zusammengefaßten Versuchsreihen verursachen fast alle geprüften Substanzen eine Verlänge-

rung der Halbwertszeit der langsamen Komponente, was auf einen kooperativen Effekt auf die langsam zerfallende Bindungskomponente hindeuten würde. Im Vergleich mit den Ergebnissen aus den thermodynamischen Verdrängungsversuchen unter Gleichgewichtsbedingungen und den daraus gewonnenen "Hill-Koeffizienten" ergibt sich ein Widerspruch insofern, daß z.B. d-LSD dort einen "Hill-Koeffizienten" von Eins ergab, trotzdem aber die Halbwertszeit der langsamen Zerfallskomponente verlängert wurde. Dieser Widerspruch veranlaßte weitere Untersuchungen.

Im Zuge dieser Untersuchungen zeigte sich dann, daß die langsame Komponente des Zerfalls selbst nicht einheitlich ist, sondern ihrerseits aus zwei Komponenten besteht. Diese beiden Komponenten lassen sich jedoch aufgrund ihrer bei 25°C eng beieinander liegenden Halbwertszeiten nur gelegentlich und nur unter speziellen Bedingungen nachweisen und entgingen daher anfänglich der Beobachtung. Zerfallskurven, die auf drei Komponenten des Zerfalls hindeuteten, wurden erstmalig in Anwesenheit des Tryptamin- (49), Serotonin- und d-LSD-Antagonisten (18) Methergolin beobachtet. Die Existenz von mindestens 3 Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion, von denen gebundenes, radioaktives d-LSD freigesetzt werden kann, wurde evident bei der Untersuchung der Zerfälle bei verschiedenen Temperaturen, die zur Berechnung der Aktivierungsenergien des Zerfalls durchgeführt wurden. Nachdem durch diese Versuchsreihen das Vorhandensein dreier Zerfallskomponenten gesichert worden war, konnte auch bei 25°C durch Verlängerung der Zerfallszeiten von 110 Min. auf 230 Min. die dritte Komponente

eindeutig sichtbar gemacht, und wie in Anhang I/2 gezeigt, auch statistisch gesichert werden. Die beiden Teilkomponenten der bisherigen "langsamen" Komponente werden im Folgenden als "mittelschnelle" (B) und "langsame" (C) Komponente bezeichnet. Die "schnelle" Komponente wird als Komponente "A" bezeichnet. (Abb. 7)

3.2.2.1.4 Die Aktivierungsenergien des Zerfalls der d-LSD-Bindungsproteinkomplexe:

Zur Durchführung der Zerfallsexperimente bei verschiedenen Temperaturen wurde die Membransuspension nach Ablauf der Standard-Inkubation über 90 Min. bei 25°C in einen Ultrathermostaten mit der gewünschten Zerfallstemperatur überführt. Der Temperatur-Angleich des Inkubationsgemisches erfolgte in etwa 10 Min. und wurde mit dem Thermometer kontrolliert. Dann wurde der Zerfall wie im Standardverfahren durch Zupipettieren der hochkonzentrierten unmarkierten d-LSD-Lösung durchgeführt.

In der halblogarithmischen Darstellung zeigten die Zerfallsggeraden bei den von 25°C verschiedenen Temperaturen durchweg eine Freisetzung des radioaktiv markierten d-LSD von 3 Bindungsstellen. Die Auflösung in Geraden, die den Zerfall für die einzelnen Komponenten repräsentierten, erfolgte analog zu dem Verfahren im Zweikomponentensystem. In Anhang I/2 wird an einem Original-Beispiel dargelegt, daß sich die mittels logarithmischer Kurvenanpassung mit der Methode der kleinsten Quadrate das Bestimmtheitsmaß r^2 nur unter

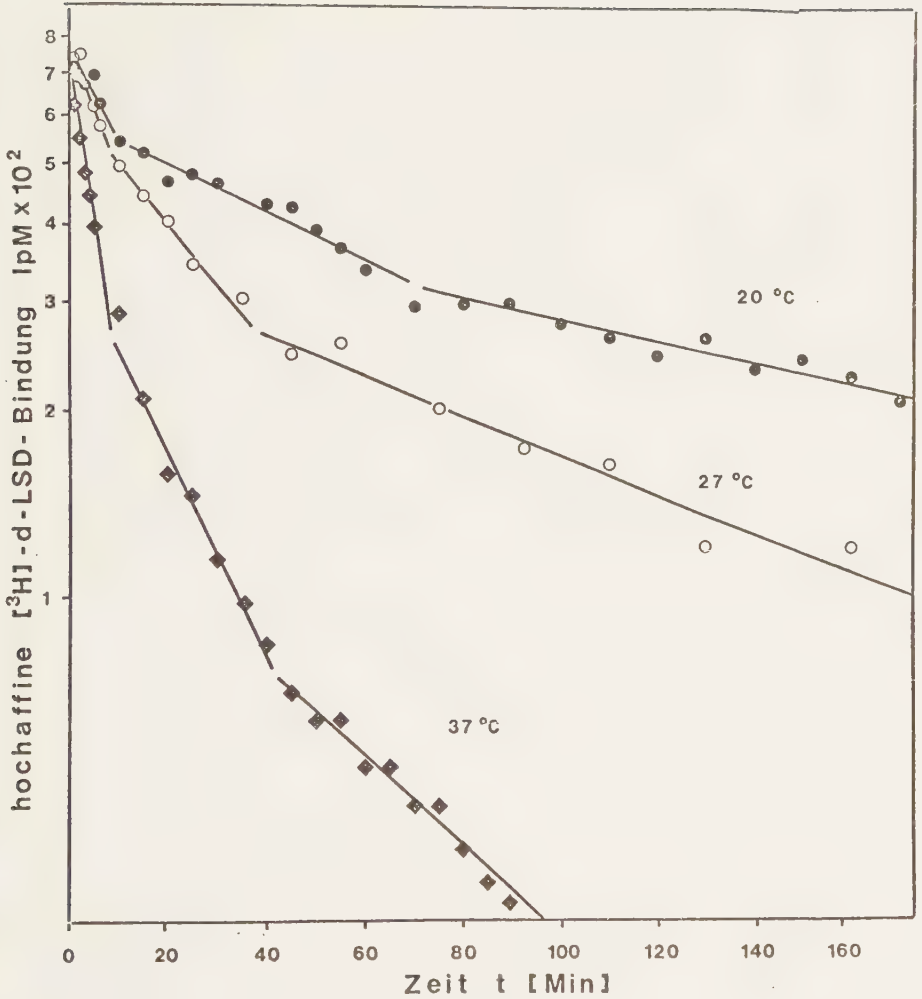


Abbildung 7: Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeiten von der Temperatur: Jeweils 12 ml Proteinsuspension wurden entsprechend dem Standardverfahren 90 Min. bei 25 °C inkubiert und in einen Ultrathermostaten mit der gewünschten Temperatur überführt. Nach Temperaturangleich wurde der Zerfall durch Zugabe von 120 μl unmarkierter d-LSD-Lösung (1,2 mM) eingeleitet (vergl. Legende Abb. 6).

Annahme von 3 Komponenten optimieren läßt. Aus den Halbwertszeiten dieser Komponenten wurden wieder die Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} berechnet und dann zur Bestimmung der Aktivierungsenergien der Dissoziation der einzelnen Bindungskomponenten Logarithmus k_{-1} gegen $1/T$ aufgetragen, wobei T die absolute Temperatur in Grad Kelvin ist (Abb. 8).

Es ergab sich eine lineare Abhängigkeit von Logarithmus k_{-1} gegenüber $1/T$ für die schnelle (A) und die langsame Komponente (C). Die Aktivierungsenergien waren 7,64 kcal. für die schnelle Komponente A und 10,82 kcal. für die langsame Komponente C über den gesamten untersuchten Temperaturbereich von 15 bis 40°C. Die mittelschnelle Komponente (B), deren durch Extrapolation gewonnene Halbwertszeit für 25°C bei 13,0 Min. liegt, zeigte jedoch bei ansteigender Temperatur einen Wechsel der Aktivierungsenergie von 18,67 kcal. im Temperaturbereich unter 27°C auf 5,54 kcal. im Temperaturbereich über 27°C. Dieser ausgeprägte Sprung der Aktivierungsenergie bei 27°C deutet auf eine Änderung im Mechanismus der Bindung hin und wäre mit dem Verhalten einer allosterisch regulierten oder kooperativ reagierenden Bindungsstelle zu vereinbaren. Er ist ein Hinweis darauf, daß die betroffene Bindungsstelle in zwei Konformationen mit unterschiedlicher Aktivierungsenergie der Dissoziation vorliegen kann. Zunächst muß noch offenbleiben, welcher Effektor in vivo diese Konformationsänderung bewirken kann. Bei Berücksichtigung der Hill-Koeffizienten scheint d-LSD selbst nicht die Affinität eines der Bindungsproteine zu verändern und auch aus kineti-

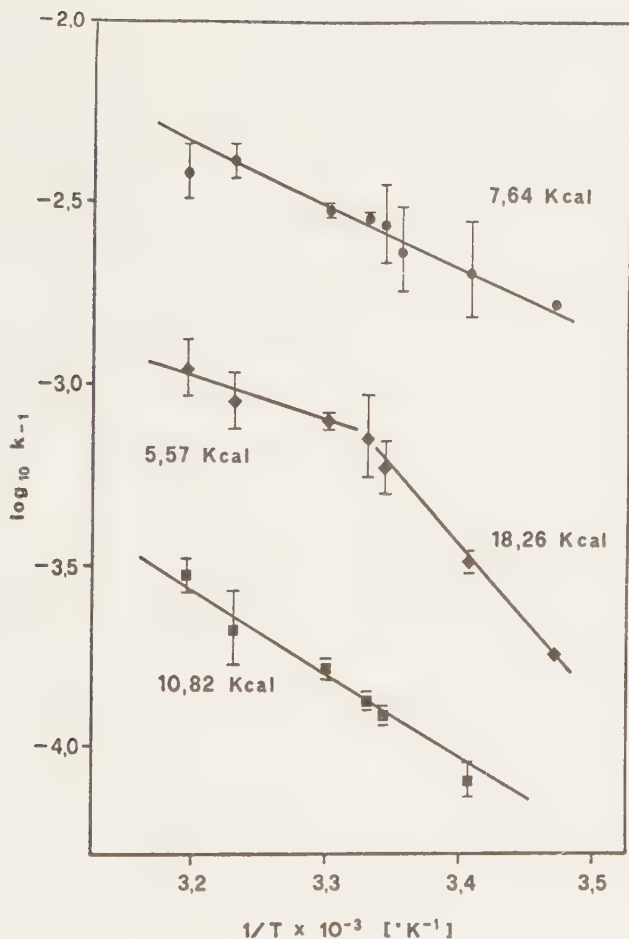


Abbildung 8: Aktivierungsenergien des Zerfalls der [^3H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe: Darstellung nach Arrhenius. Die bei verschiedenen Zerfallstemperaturen gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} der drei nachweisbaren Zerfallskomponenten wurden als $\log_{10} k_{-1}$ gegen die reziproke absolute Temperatur $1/T$ in Grad Kelvin aufgetragen.

- Schnelle Komponente A. ◆ Mittelschnelle Komponente B. ■ Langsame Komponente C. Die senkrechten Balken repräsentieren die Standardabweichung von zwei bis vier Zerfällen. Bei 15°C nur ein Experiment. Die Zerfallstemperaturen waren $15, 20, 26, 27, 30, 37$ und 40°C .

schen Experimenten mit unmarkiertem d-LSD kann man einen kooperativen Effekt des d-LSD auf die d-LSD-Bindung ausschließen (siehe unten). Dagegen erschien das Tryptamin wegen seines starken Effektes auf die Halbwertszeit der langsamen Komponente (Tabelle 4) und wegen seines konzentrationsabhängigen Hill-Koeffizienten (Tabelle 3) von größer als Eins als möglicher Kandidat für einen Effektor eines allosterisch regulierten d-LSD-Rezeptorproteins. Zur Wirkung des Tryptamins wurden deshalb weitere Versuche durchgeführt.

3.2.2.1.5 Der Einfluß des Tryptamins auf die d-LSD-Bindung:

Es wurden Zerfallsexperimente in Anwesenheit von Tryptamin entsprechend der IC_{50} -Konzentration durchgeführt, wobei die Temperatur, bei der der Zerfall gemessen wurde, auf 37°C erhöht wurde. Auf diese Weise konnten die drei Komponenten des Zerfalls eindeutig dargestellt werden und deren Verhalten in Anwesenheit von Tryptamin untersucht werden. Die Zerfallskinetik mit 10 μ M Tryptamin bei 37°C zeigte, daß die langsame Komponente C des Zerfalls durch Tryptamin auf 124,5 Min. gegenüber der Kontrolle von 55,3 Min. (bei 37°C!) verlängert wird. Die Halbwertszeit der mittelschnellen Komponente B änderte sich dagegen im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abb. 9).

Die Verlängerung der Zerfallshalbwertszeiten durch Tryptamin, wie sie in Tabelle 4 dargestellt ist, beruht also auf der Verlängerung der Halbwertszeit der langsamen Komponente C. Auf der anderen Seite aber scheint das Tryptamin eine hohe spezifische Affinität zur mittelschnellen Komponente B zu besitzen:

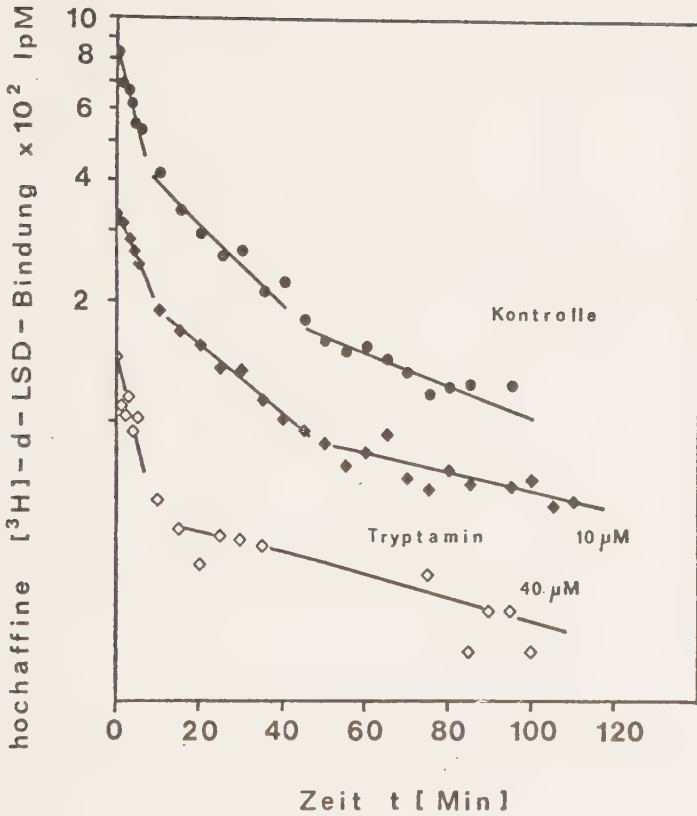


Abbildung 9: Zerfall der [³H]-d-LSD-Bindungsprotein-komplexe nach simultaner Inkubation mit 10,0 µM Tryptamin (◆) und 40,0 µM (◇) Tryptamin bei 37°C. Kontrolle ohne Zusatz, jedoch wie die Proben mit Tryptamin unter Zusatz von Pargylin (10 µM Endkonzentration). Zum Ablauf vergleiche Legende der Abb.6 (Isotopenverdünnungsmethode).

Bei einer Endkonzentration von $40 \mu\text{M}$ Tryptamin war die mittelschnelle Komponente des Zerfalls nicht mehr nachweisbar. Es könnte sich also bei der mittelschnellen Zerfallskomponente der d-LSD-Bindungsproteine um einen Tryptamin-Rezeptor handeln, der zum einen eine hohe Affinität zu d-LSD hat, weil Tryptamin erst in den relativ hohen Konzentrationen von $10-40 \mu\text{M}$ das d-LSD von dieser Bindungsstelle verdrängen kann, zum Anderen scheint dieser Effekt aber bei Erreichen der kritischen Konzentration von Tryptamin quantitativ abzulaufen, weil die mittelschnelle Komponente bei $40 \mu\text{M}$ Tryptamin nicht mehr von markiertem d-LSD besetzt wird. Dieser Befund ist konform mit dem steilen Anstieg des Hill-Koeffizienten bei Tryptamin in diesem Konzentrationsbereich und mit dem Befund einer möglichen Allosterie der mittelschnellen Komponente B aus der Bestimmung der Aktivierungsenergie (Arrhenius-Darstellung).

3.2.2.1.6 Zerfallsversuche mit Synaptischen Membranen (Tabelle 5): Präparationen Synaptischer Membranen nach Jones und Matus (31) wurden mit der Komplex-Zerfallsmethode untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.5.) konnte unter Gleichgewichtsbedingungen eine hochaffine Bindungsstelle für d-LSD in der Fraktion Synaptischer Membranen mit einer Gleichgewichtskonstanten $K_D = 2,5 \pm 0,2 \text{ nM}$ nachgewiesen werden. Die hier gezeigten Ergebnisse aus den Zerfallsversuchen sprechen für das Vorhandensein von 2 Typen von hochaffinen d-LSD-Bindungsstellen in dieser Membranfraktion, die unter Pargylin in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ durch die Halbwertszeiten von $T_1 = 3,30 \text{ Min.}$ ($k_{-1} = 3,50 \times 10^{-3} \text{ Sek.}^{-1}$) und

Tabelle 5: Dissoziation des gebundenen [³H]-d-LSD in der Fraktion Synaptischer Membranen des Rattengroßhirns nach halbmaksimaler Besetzung der d-LSD-Bindungsstellen mit unmarkierten verdrängenden Substanzen durch Zusatz von unmarkiertem d-LSD: Isotopenverdünnungsmethode, 25°C, hochaffine [³H]-d-LSD-Bindung in IpM.
Freisetzung der Radioaktivität von Komponente A und C, Komponente B nicht nachweisbar.

Zusatz (Konzentration)		Halbwertszeiten T (Min.)	freigesetztes [³ H]-d-LSD (IpM)
d-LSD-Kontrolle (ohne Zusatz)	ohne Pg	4,5 ± 1,5 (4)	53,8 ± 6,9 (4)
		135,0 ± 42,4 (4)	143,0 ± 7,4 (4)
	mit Pg	3,3 ± 0,4 (2)	37,0 ± 1,4 (2)
d-LSD-Kontrolle (ohne Zusatz)		117,5 ± 3,5 (2)	142,5 ± 0,7 (2)
d-LSD (6 nM)	mit Pg	3,8 ± 0,4 (2)	20,5 ± 3,5 (2)
		139,0 ± 22,6 (2)	108,0 ± 0,0 (2)
5-HT (160 nM)	mit Pg	nicht nachweisbar (2)	nicht nachweisbar (2)
		182,0 ± 17,0 (2)	62,0 ± 0,0 (2)
Dopamin (500 µM)	mit Pg	7,9 ± 0,5 (2)	26,0 ± 9,9 (2)
		98,5 ± 0,7 (2)	109,0 ± 1,4 (2)
BOL (16 nM)	mit Pg	12,8 ± 2,0 (4)	21,8 ± 1,5 (4)
		195,8 ± 76,1 (4)	39,8 ± 2,9 (4)
CaCl ₂ (10 mM)	ohne Pg	13,8 ± 1,2 (4)	41,8 ± 7,5 (4)
		184,5 ± 8,8 (4)	113,5 ± 4,4 (4)

Pg bedeutet Pargylin in einer Endkonzentration von 10 µM. Anzahl der Versuche in Klammern.

$T_2 = 117,5$ Min. ($k_{-1} = 9,82 \times 10^{-5}$ Sek. $^{-1}$ gekennzeichnet sind. Ohne Pargylin hatte die schnelle Komponente eine identische Halbwertszeit von $T_1 = 4,5$ Min. ($k_{-1} = 2,56 \times 10^{-3}$ Sek. $^{-1}$) und die langsame Komponente eine Halbwertszeit von $T_2 = 135,0$ Min. ($k_{-1} = 8,58 \times 10^{-5}$ Sek. $^{-1}$). Aufgrund dieser Halbwertszeiten handelt es sich um die Komponenten A und C. Die mittelschnelle Komponente B war in keinem Zerfallsexperiment mit Synaptischen Membranen nachweisbar. Unmarkiertes d-LSD in einer Endkonzentration von $6 \mu\text{M}$ scheint die Halbwertszeit der langsamen Komponente in Anbetracht der großen Standardabweichung nicht zu verlängern und scheint die langsame Komponente bevorzugt zu besetzen.

Dopamin zeigt ein gleichsinniges Verhalten auf die d-LSD-Bindungsstellen in synaptischen Membranen wie in der Gesamtmembranfraktion und besetzt somit bevorzugt die schnelle Komponente. Dagegen verkürzt es die Halbwertszeit der langsamen Komponente auf 90 Min. Diese Versuche können wegen der niedrigen Zahl durchgeführter Zerfälle erst als Vorversuche betrachtet werden. Für Serotonin dagegen scheint das Ergebnis eindeutig zu sein: Serotonin in einer Endkonzentration von $160 \mu\text{M}$ besetzte die schnelle Zerfallskomponente A quantitativ, so daß sie nicht mehr nachweisbar war. Serotonin verlängert die Halbwertszeit der langsamen Komponente auf 182 Min., was einen kooperativen Effekt von 5-HT auf die langsame Komponente wahrscheinlich macht.

Brom-LSD besetzte in vier Versuchen bevorzugt die langsame Zerfallskomponente und verlängert den Zerfall dieser Komponente auf im Mittel 195 Min. mit der allerdings großen Standardabweichung von $\pm 76,1$ Min.

So scheint die schnelle Zerfallskomponente der Synaptischen Membranen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gesamtmembranfraktion eine höhere Affinität zu den Aminen, die langsame eine höhere Affinität zu den Lysergsäurediäthylamid-Derivaten zu besitzen.

Die hemmende Wirkung des Kalziumchlorid auf die d-LSD-Bindung an Synaptischen Membranen setzt gleichermaßen an beiden Zerfallskomponenten an:

In vier Versuchen unter einer Endkonzentration von 10 mM CaCl_2 konnte nur eine unwesentliche Differenz der von den beiden Bindungskomponenten freisetzbaren Menge an radioaktiv markiertem d-LSD im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dagegen verlängert Kalziumchlorid die Halbwertszeit der schnellen Komponente von 4,5 auf $13,8 \pm 1,2$ Min. und die der langsamen von 135,0 auf 184,5 Min. (Tabelle 5).

3.2.2.2 Zur Frage der Kooperativität:

Zerfallsversuche in Volumenverdünnungsmethode:

Die Volumenverdünnungsmethode ist gut dazu geeignet, kooperative Einflüsse von Substanzen auf die Bindung des radioaktiv markierten Liganden zu untersuchen (68). Dabei setzt man dem Verdünnungspuffer die betreffende Substanz in der gewünschten Endkonzentration zu und kann dann bei einer vorhandenen Kooperativität eine Veränderung der Zerfallshalbwertszeiten nachweisen. Der Unterschied zur Isotopenverdünnungsmethode besteht darin, daß die bei der Abdissoziation des markierten Liganden frei werdenden Bindungsstellen frei bleiben und nicht durch unmarkierten Liganden besetzt werden. Diese Annahme gilt

allerdings nur bei "unendlicher" Verdünnung. Außerdem können auch in der Volumenverdünnungsmethode artifiziell verlängerte Halbwertszeiten des Zerfalls durch zusätzliche Effekte auftreten (Retentionseffekt) (68).

Nach der Standard-Inkubation über 90 Min. bei 25° C von 16 ml Suspension der Gesamtmembranfraktion mit 2 nM Endkonzentration an radioaktiv markiertem d-LSD wurde das Inkubationsgemisch in Erlenmeyer-Kolben mit 320 ml temperiertem Tris-HCl-Puffer (25 mM, pH 7,4) geschüttet und nach schnellem Umrühren zu den verschiedenen Zeiten jeweils 10 ml Suspension entnommen und über Whatman GF/B-Glasfaserfilter abfiltriert. Wegen der großen Probenmenge auf dem Filter wurde bei diesem Verfahren nur einmal mit 10 ml eiskaltem Tris/HCl-Puffer nachgewaschen. Die Verdünnung in diesen Zerfallsversuchen ist demnach nur 1:20 und nicht 1:100, wie sonst allgemein angewandt (68). Aufgrund der sich bei einer Verdünnung von 1:100 ergebenden großen Volumina und der daraus resultierenden Schwierigkeiten beim Temperieren und beim Bindungstest - es wären dann 50 ml Protein-Suspension pro Bindungstest zu filtrieren gewesen - wurde nur eine Verdünnung von 1:20 angewandt. Bei der Auswertung der Zerfälle mußte deshalb die gebundene Radioaktivität mit einem rechnerisch bzw. graphisch ermittelten Wert für die "Restbindung" bei $2/_{20}$ nM [^3H]-d-LSD korrigiert werden. Dieser Wert lag bei 45-50 IpM. Der Filterleerwert war bei diesen Versuchen durch den Filtrationsschritt bei 25°C niedriger als bei 0°C und betrug im Mittel 49,5 IpM. (Zur Durchführung vergleiche Abschnitt 2.2.3.).

Das Ergebnis ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Unmarkiertes d-LSD in einer Endkonzentration von 12 nM im Verdünnungsmedium beeinflußt nicht signifikant die Halbwertszeiten des Zerfalls, es besteht also kein Hinweis auf eine kooperative Wirkung des d-LSD.

Bei den Zerfällen mit Serotonin in einer Endkonzentration von 160 nM im Verdünnungsmedium wurde die Halbwertszeit der langsamen Komponente auf 108,0 Min. gegenüber 43,4 Min. bei der Kontrolle verlängert, was auf einen kooperativen Effekt des Serotonins auf die d-LSD-Bindung an die langsam zerfallende Komponente hindeutet. Dabei zeigte sich überraschenderweise jedoch unter Serotonin eine Dissoziation des markierten d-LSD von 3 Bindungskomponenten, von denen die mittelschnelle Komponente eine Halbwertszeit von 14,2 Min. und die schnelle eine Halbwertszeit von 2,5 Min. hatte. In allen durchgeführten Zerfallsexperimenten in der Volumenverdünnungsmethode konnte nur unter Zusatz von 160 nM Serotonin im Verdünnungsmedium die Freisetzung des markierten d-LSD von 3 Bindungsstellen beobachtet werden, sonst waren nur die Komponenten A und B darstellbar. Warum dies nur unter Serotonin zu beobachten war, ist ungeklärt, wahrscheinlich lagen optimale Versuchsbedingungen vor, die sonst nicht realisierbar sind. Wegen der technischen Bedingungen der Volumenverdünnungsmethode, die eine größere Streuung der Einzelmeßwerte im Vergleich zur Isotopenverdünnungsmethode mit sich bringt, ist es nämlich eher unwahrscheinlich, mehr als 2 Zerfallskomponenten mit der Volumenverdünnungsmethode nachweisen zu können (vergleiche Diskussion).

Tabelle 6: Zur Frage der Kooperativität: Dissoziation der hochaffinen [^3H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe in der Gesamtmembranfraktion durch Volumenverdünnung unter Zusatz des putativen Effektors im Verdünnungsmedium 25°C.

Zusatz im Verdünnungsmedium, Endkonzentration	Halbwertszeiten (Min.)	freigesetzte IpM von beiden Komponenten
1) ohne Pargylin		
Kontrolle ohne Zusatz	(3) 7,2 ± 0,7	115,7 ± 15,5
		232,3 ± 15,0
d-LSD, 12 nM	(3) 7,1 ± 2,3	125,7 ± 14,8
		243,7 ± 25,0
2) mit Pargylin		
Kontrolle ohne Zusatz	(3) 6,6 ± 1,9	90,3 ± 24,5
		238,0 ± 30,1
d-LSD, 12 nM	(3) 5,9 ± 0,9	64,0 ± 9,5
		205,0 ± 26,2
5-HT 160 nM *)	(2) 2,5 ± 0,0	25,5 ± 0,7
		29,0 ± 9,9
		108,0 ± 17,0

Anzahl der Versuche in Klammern

*) bei 5-HT wurde bereits die Inkubation unter 160 mM unmarkiertem 5-HT durchgeführt, so daß die Bindungsstellen halbmaximal durch 5-HT besetzt waren. Dissoziation von drei Bindungsstellen A, B und C.

3.2.2.2.1 Die Spezifität der d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns: Volumenverdünnungsmethode: Die Zerfälle nach halbmaximaler Besetzung der Bindungsstellen, die analog zu den Versuchen in der Isotopenverdünnungsmethode (Tabelle 4) durchgeführt wurden, zeigten für Serotonin in einer Endkonzentration von 160 nM auch hier keine signifikante Präferenz für den schnellen Zerfallstyp der Bindungsstellen (Tabelle 7). 5-Methoxytryptamin (Endkonzentration 63 nM) besetzte auch in dieser Versuchsreihe bevorzugt die schnelle Zerfallskomponente und Brom-LSD (Endkonzentration 16 nM), für das keine Vergleichswerte in der Isotopenverdünnungsmethode vorliegen, besetzte hier sehr viel stärker die langsame Zerfallskomponente. Dieser Befund ist in Einklang mit dem Ergebnis der Versuche mit Synaptischen Membranen in der Isotopenverdünnungsmethode:

Auch dort wurde die langsame Zerfallskomponente bevorzugt durch BOL besetzt. Das halluzinogene 5-MEOT-NN-DMT besetzt bevorzugt die schnelle "aminerge" Zerfallskomponente (siehe Diskussion). Die langsame Komponente C war bei diesen Versuchen nicht nachweisbar. Wegen der niedrigen Anzahl der Zerfälle wurde hier keine statistische Signifikanzberechnung durchgeführt.

3.3. Phenoxybenzamin: Irreversible Hemmung der d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion:

Unter halbmaximaler Hemmung der d-LSD-Bindung durch Phenoxybenzamin (entsprechend einer Endkonzentration von 1,0 μM), wurden Zerfallsversuche im Standardverfahren, d.h. nach simultaner Inkubation von d-LSD und Phenoxybenzamin, durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß unter Anwesenheit von 1 μM

Tab. 11.7: Dissoziation der hochaffinen [³H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe in der Gesamtmembranfraktion bei 25°C: Volumenverdünnungsmethode. Freisetzung der Radioaktivität von Komponente A und B, Komponente C nicht nachweisbar.

Zusatz im Inkubationsansatz Endkonzentration	Halbwertszeiten (Min.)	freigesetzte Impulse μ M von beiden Komponenten	normiert auf die Kontrolle (307 IpM)	50% des Meßwertes
Kontrolle ohne Zusatz	(2)	109 $\pm$ 8,5		54,5
		198 $\pm$ 17,7		99,0
5-HT, 160 nM	(2)	38,0 $\pm$ 9,9		59,5
		60,0 $\pm$ 14,1		94,0
5-MEOT, 63 nM	(2)	22,5 $\pm$ 5,0		26,9
		106,0 $\pm$ 5,7		126,6
5-MEO-N,N-DMT, 72 nM	(2)	37,5 $\pm$ 3,5		37,5
		112,0 $\pm$ 2,8		112,0
BOL, 16 nM	(2)	84,0 $\pm$ 8,5		87,1
		64,0 $\pm$ 5,7		66,4

Alle Ansätze mit Pargylin in einer Endkonzentration von 10 μ M
Zur Durchführung vergleiche Abschnitt Materialien und Methoden (2.2.2.) .

Phenoxybenzamin etwa 20% der hochaffinen d-LSD-Bindung im Zerfallsversuch nicht abdissoziierten, demzufolge also irreversibel gebunden bleiben. Es wurde nun folgender Versuch durchgeführt:

Die Gesamtmembranfraktion wurde mit 1 μ M Endkonzentration Phenoxybenzamin in 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 bei 25°C für 90 Min. inkubiert. Danach wurde die Proteinsuspension auf Eis auf 4°C heruntergekühlt und 45 Min. bei 100.000 $\times$ g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 mM Tris/HCl-Puffer resuspendiert (Potter-Homogenisator) und 15 Min. bei 25°C gehalten. Danach wurde wieder bei 4°C 45 Min. bei 100.000 $\times$ g zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in 25 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und anschließend sofort zum Bindungstest eingesetzt. Ein analog gewaschenes Aliquot der Gesamtmembranfraktion ohne Phenoxybenzamin diente als Kontrolle.

Ergebnis: Gebundenes radioaktiv markiertes d-LSD dissoziierte bei den mit Phenoxybenzamin vorbehandelten Membranen nur von 2 Bindungsstellen ab (Abbildung 10). Die Menge an hochaffin gebundenem d-LSD bleibt selbst nach Auswaschen des Phenoxybenzamins um die Hälfte der Kontrolle reduziert. Das bedeutet, daß entweder Phenoxybenzamin nach dem Auswaschen irreversibel d-LSD-Bindungsstellen besetzt hält, oder daß Phenoxybenzamin die betreffenden Bindungsstellen irreversibel verändert hat, so daß sie kein d-LSD mehr binden.

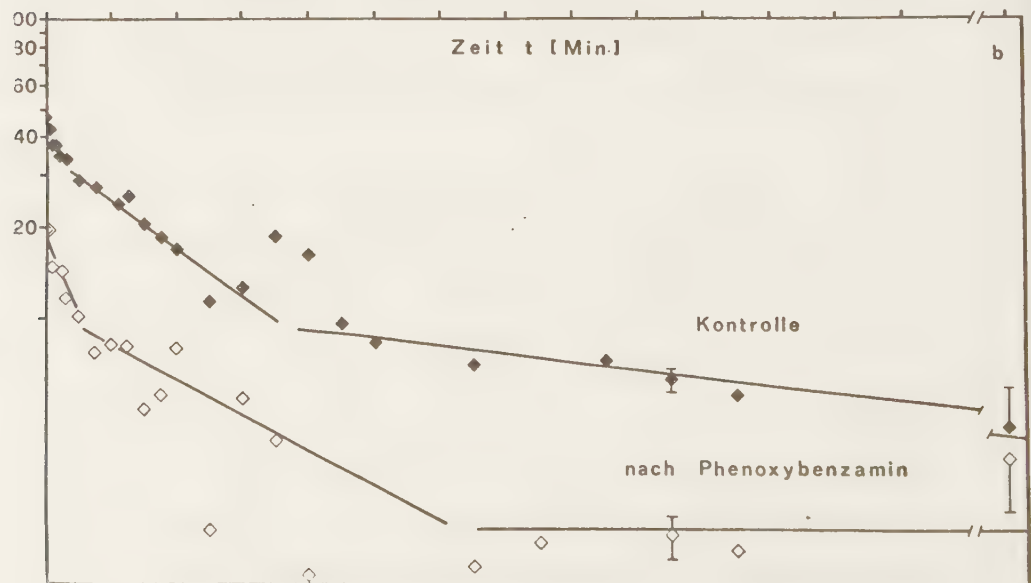
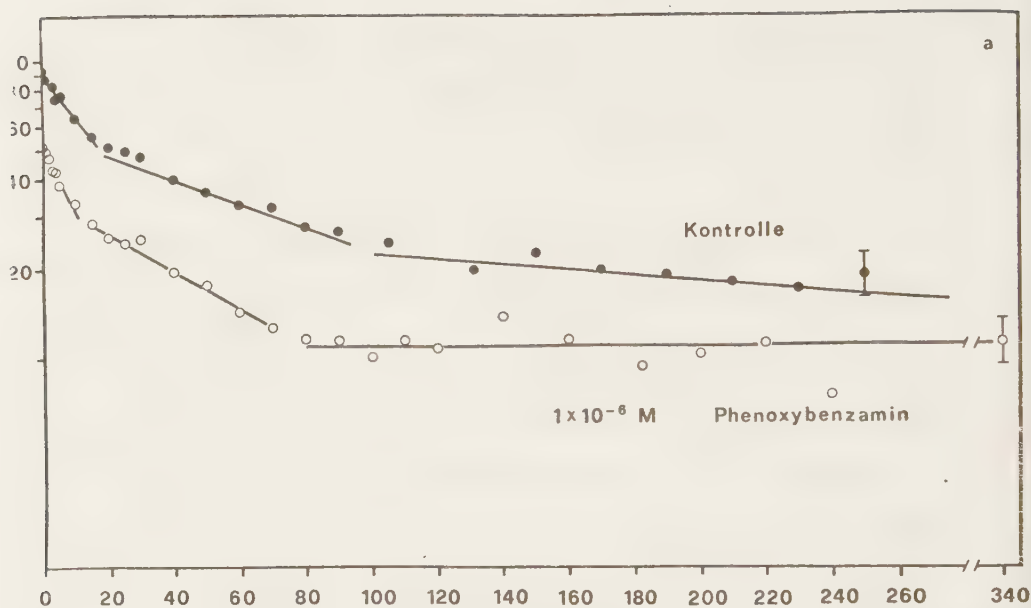


Abbildung 10: Zerfälle der hochaffinen [^3H]-d-LSD-Bindungsproteinkomplexe unter Phenoxybenzamin (a) und nach Phenoxybenzaminvorbehandlung (b).

- a: Zerfall nach simultaner Inkubation von [^3H]-d-LSD (Endkonzentration 2,0 nM) mit Phenoxybenzamin (1,0 μM) (o) sowie Kontrolle (●) ohne Zusatz.
- b: Zerfall nach Vorinkubation der Gesamtmembranfraktion mit 1,0 μM (Endkonzentration) Phenoxybenzamin (◇) und nachfolgendem zweimaligem Auswaschen: Die Vorinkubation wurde über 90 Min. bei 25° durchgeführt, das Auswaschen mittels zweimaliger Zentrifugation bei 100.000 g über 90 Min. Identische Behandlung der Kontrolle (◆) mit Ausnahme der Vorinkubation, die ohne Zusatz durchgeführt wurde. Der weitere Zerfallsablauf erfolgte wie bei Abb. 6 beschrieben, der letzte Kurvenpunkt ist dreifachbestimmt mit Standardabweichung.

Denkbar wäre dabei eine Alkylierung analog zum Alpha-adrenergen Fettzell-Rezeptor (25). Die Zerfallskinetik zeigt, daß die langsam zerfallende Bindungskomponente C der d-LSD-Bindungsproteine durch die Vorbehandlung mit 1,0 μM Phenoxybenzamin total eliminiert wurde. Die mittelschnelle Komponente B wurde um die Hälfte reduziert, während die Konzentration der schnellen Zerfallskomponente A durch die Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin nicht beeinflußt wurde. Damit eröffnet sich eine Möglichkeit der Zuordnung der im Zerfall dargestellten Bindungskomponenten zu den unter Gleichgewichtsbedingungen nachweisbaren Bindungsstellen in der Scatchard-Darstellung.

3.3.1. Irreversible Hemmung der d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion durch Phenoxybenzamin: Darstellung nach Scatchard:

Die Gesamtmembranfraktion wurde wie beschrieben mit 1,0 μM Phenoxybenzamin inkubiert und zweimal durch Zentrifugation gewaschen. Die Kontrolle wurde ohne Phenoxybenzamin, sonst aber identisch, behandelt. Die Darstellung der Bindungsdaten nach Scatchard zeigt, daß nach Phenoxybenzamin-Behandlung unter Gleichgewichtsbedingungen nur noch eine Bindungskomponente nachweisbar ist (Abbildung 11). Die Kontrolle zeigt

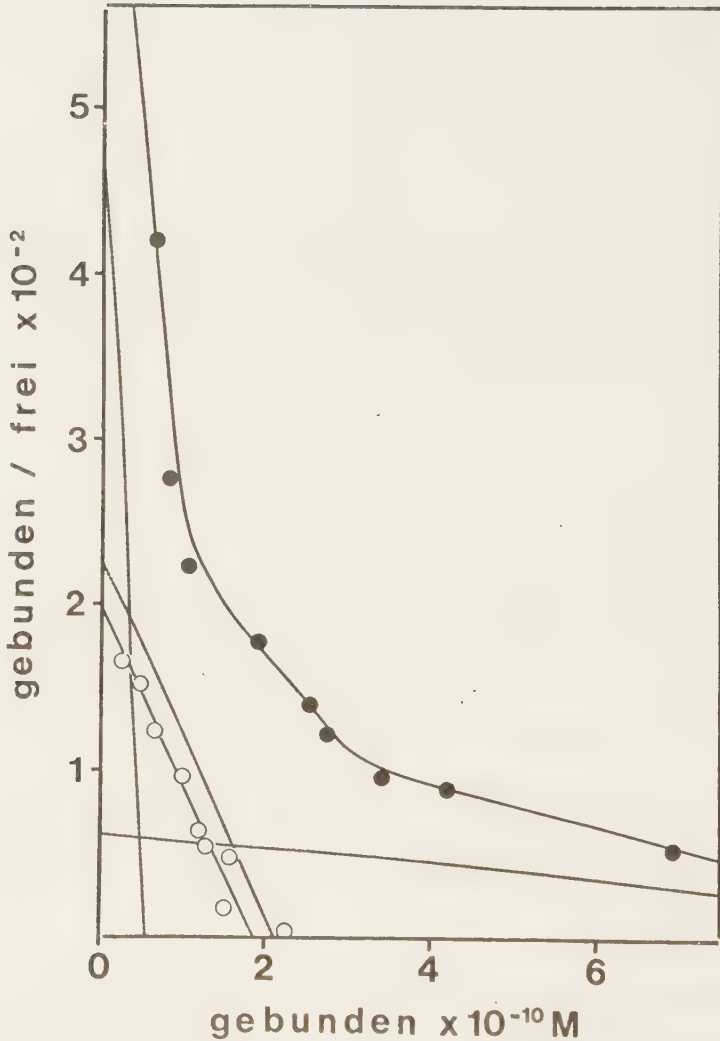


Abbildung 11: Hochaffine [³H]-d-LSD-Bindung in der Gesamtmembranfraktion nach Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin (O) und Kontrolle (●). Nach Vorinkubation der Gesamtmembranfraktion mit 1,0μM Phenoxybenzamin und nachfolgendem Auswaschen mittels Zentrifugation über 90 Min. bei 100.000 × g wurde das Standardbindungstestverfahren durchgeführt (vergl. Legende Abb.3). Die Kontrolle wurde in gleicher Weise behandelt, nur daß die Vorinkubation ohne Phenoxybenzamin durchgeführt wurde. Dreifachbestimmung.

hier im Gegensatz zu früheren Experimenten eine d-LSD-Bindung an drei Komponenten. Diese höhere Auflösung der Bindungskurve läßt sich wahrscheinlich auf die Verwendung eines markierten d-LSD mit höherer spezifischer Aktivität im Vergleich zu den Vorversuchen sowie auf die Vorinkubation der Gesamtmembranfraktion zurückführen. Die Auflösung der Bindungskurve nach Rosenthal ergab für die Kontrolle Werte für die Gleichgewichtskonstanten von $K_{D1} = 1,2 \text{ nM}$, $K_{D2} = 9,4 \text{ nM}$ und $K_{D3} = 250 \text{ nM}$. Nach der Phenoxybenzamin-Behandlung erscheint nur noch die mittelaaffine Komponente mit $K_{D2} = 9,2 \text{ nM}$ und der gleichen Konzentration wie im Kontrollversuch. Die mittelaaffine Komponente scheint also durch die Vorbehandlung mit $1 \text{ } \mu\text{M}$ Phenoxybenzamin nicht beeinflußt worden zu sein. Im Gegensatz dazu ist die hochaffine Komponente mit der $K_{D1} = 1,2 \text{ nM}$ nach Phenoxybenzamin nicht mehr nachweisbar und die schwächer affine Komponente mit $K_{D3} = 250 \text{ nM}$ nur noch in einer solch niedrigen Konzentration vorhanden, daß sie nicht mehr sicher dargestellt werden kann. Damit erscheint evident, daß die langsame Komponente C des Komplexzerfalls identisch ist mit der höchstaffinen Komponente mit der K_{D1} von $1,2 \text{ nM}$, wie sie aus den Scatchard-Darstellungen bekannt war. Die mittelaaffine Komponente mit der K_{D2} bei 9 nM stellt sich nach Phenoxybenzamin im Scatchard-Plot unverändert dar. Ebenso unverändert bleibt die mittelschnelle Komponente B nach Phenoxybenzamin in den Zerfallsversuchen, was für die Identität dieser unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesenen Bindungsstellen spricht. Somit ergibt sich aus der irreversiblen Blockade der d-LSD-Bindungsstellen durch Phenoxybenzamin eine leistungsfähige Methode für weitere Rezeptorstudien.

4. Diskussion

Die Existenz multipler Rezeptorpopulationen für d-LSD, war, wie in der Einleitung dargelegt wurde, zu Beginn dieser Arbeit durchaus umstritten. Maßgebliche Arbeiten aus dieser Zeit gingen von der Existenz einer uniformen Rezeptorklasse für d-LSD in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns aus (3,4). Erste Hinweise auf die Heterogenität der d-LSD-Bindungsstellen wurde dann im Laufe der folgenden Jahre durch verschiedene Arbeiten (51,66), aber auch durch eigene Untersuchungen (32,64) gefunden, so daß die Auffassung eines uniformen Rezeptorproteins für d-LSD revidiert werden mußte. Auch war ein Trend zu niedrigeren Dissoziationskonstanten festzustellen, der aber wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit eines tritiierten d-LSD mit höherer spezifischer Aktivität verursacht war.

Daß d-LSD mit hinreichend hoher Affinität an Serotonin- und Dopaminrezeptoren bindet und in Konzentrationen im Nanomolbereich mit den physiologischen Liganden um diese Bindungsstellen konkurriert, ist inzwischen unbestritten (2,51,54,66). Neben den bereits länger durch elektrophysiologische Untersuchungen von Rogawski et al. (59) definierten prae- und postsynaptischen Serotoninrezeptoren wurde von Peroutka et al. (51) sog. 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptoren in kortikalen Rattengroßhirnarealen postuliert, die durch differenzielle Bindung von 5-HT und Spiroperidol unterschieden wurden, wobei d-LSD an beide Rezeptortypen in gleichem Ausmaß band. Dabei muß mit

den oben erwähnten prae- und postsynaptischen 5-HT-Rezeptoren kein Zusammenhang bestehen.

Weiter sind auch bei den Dopaminrezeptoren zwei Populationen, die als D_1 - und D_2 -Rezeptoren bezeichnet werden (67), nachgewiesen worden, wobei der D_2 -Rezeptor in zwei verschiedenen Affinitätsstadien vorliegen kann (22).

Nachdem auch Tryptamin mit d-LSD in niedrigen Konzentrationsbereichen interferiert, ist auch dessen Rezeptorprotein als d-LSD-Bindungsstelle zu berücksichtigen, obwohl diesbezügliche Untersuchungen noch keine eindeutigen Ergebnisse erbrachten (5).

Zusammenfassend ergibt sich also, daß radioaktiv markiertes d-LSD im Rattengroßhirn wahrscheinlich mindestens fünf verschiedene Rezeptortypen mit hoher Affinität markiert. Wie in der Einleitung dargelegt, war dieser Sachverhalt zu Beginn dieser Arbeit zwar zu vermuten, nicht bekannt war aber jedoch, daß die Dissoziationskonstanten des d-LSD zu diesen Neurotransmitter-Rezeptortypen alle im Nanomolbereich oder niedrigen Mikromolbereich liegen und somit nebeneinander nur schwer nachzuweisen sind.

Diese Nachweismöglichkeit hängt vom Auflösungsvermögen der Nachweismethode ab. Die früher benutzte Darstellung der im thermodynamischen Gleichgewicht stehenden Bindung des radioaktiv markierten Liganden an das Bindungsprotein war dabei nur wenig leistungsfähig. Deshalb wurden reziproke Darstellungen der Bindungskurven entwickelt, um diese nichtlinearen

Bindungskurven graphisch zu liniarisieren. Eine Abweichung von der Liniarität zeigte dann das Vorliegen mehrerer Bindungsstellen an. Die für Bindungsstudien am häufigsten benutzte reziproke Darstellung ist neben derjenigen nach Hofstee (26) diejenige nach Scatchard (61), die auch in vorliegender Arbeit angewandt wurde. Zwar schreibt Rosenthal (60), die die Auflösung dieser bei mehreren Bindungsstellen ebenfalls nicht linearen Bindungskurven in Bindungsgeraden berechnete, daß man mittels ihrer Auflösungsmethode bei drei Bindungskomponenten auch drei Bindungsgeraden konstruieren könne, doch war das Verfahren weder explizit angegeben, noch konnten in der Literatur Beispiele gefunden werden, in denen eine Bindungskurve in Scatchard-Darstellung in mehr als zwei Bindungsgeraden aufgelöst wurde. Auch eigene Versuche waren diesbezüglich nur in Ausnahmefällen erfolgreich. Somit reicht das Auflösungsvermögen dieser Methode im Allgemeinen nicht aus, um drei Bindungsstellen nebeneinander nachweisen zu können. Nur in Ausnahmefällen mit sehr geringer Streuung der Einzelwerte dürfte dies möglich sein (vergl. Scatchard-Plot der Kontrolle des Phenoxybenzaminversuchs, Abb. 11).

Ein höheres Auflösungsvermögen hat die hier angewandte Methode, die Kinetik des Zerfalls der d-LSD-Bindungsprotein-komplexe zu verfolgen. Mit dieser Methode konnten in vorliegender Arbeit mit hinreichender Sicherheit und auch statistisch abgesichert drei Bindungskomponenten in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns nachgewiesen werden, in der gleichzeitig mit der thermodynamischen Methode der Mes-

sung der Bindung nach Gleichgewichtseinstellung bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen und der daraus gewonnenen Darstellung der Bindungskurve nach Scatchard nur zwei Typen von d-LSD-Bindungsstellen nachweisbar waren. Somit konnte durch die Einführung dieser neuen kinetischen Methode ein wesentlicher Informationszuwachs erzielt werden.

Zwar spielt auch hier, wie bei der thermodynamischen Methode, die Meßgenauigkeit des Einzelpunktes der Bindungsgeraden eine Rolle, von größerer Bedeutung ist jedoch die Anzahl der gemessenen Kurvenpunkte, die in die Konstruktion der Zerfallsgeraden eingehen. Die Bindungskomponenten werden in der kinetischen Komplexzerfallsmethode durch die Rate der freisetzbaren Impulse definiert, die sich eben nicht aus einer Einzelmessung ergibt, sondern aus der Extrapolation einer Zerfallsgeraden mit der durch mindestens 5 bis maximal 30 Meßpunkten charakterisierten Steigung m auf die Ordinate, die direkt die Impulse pro Minute angibt.

Dieses hohe Auflösungsvermögen ist allerdings auch hier abhängig von einer ausreichend großen Differenz der Geschwindigkeitskonstanten der anwesenden Bindungskomponenten voneinander. Wenn die Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} des Zerfalls der Bindungskomplexe zu wenig verschieden sind, können die daraus resultierenden Bindungsgeraden nicht mehr als verschieden erkannt werden. Welcher quantitative Unterschied in der Geschwindigkeitskonstanten bestehen muß, um die beiden sich daraus ergebenden Zerfallsgeraden als abgewinkelt

zueinander und somit als verschieden voneinander erkennen zu können, ist nicht einfach anzugeben. Vom graphischen Aspekt her ist ein Winkel von 10 bis 15 Grad zweier Geraden zueinander hinreichend, um sie als verschieden voneinander unterscheiden zu können. Dabei ist wieder die Anzahl der die Steigung bestimmenden Meßpunkte von entscheidender Bedeutung.

Dieser Sachverhalt kann auch an den vorliegenden Versuchen demonstriert werden:

Nachdem verifiziert worden war, daß sich der bis dahin als langsame Komponente bezeichnete Bindungsanteil des Zerfalls aus mindestens zwei Komponenten zusammensetzt, konnte durch Verlängerung der Zerfallszeit von 110 auf 250 Min. und damit verbundener Vermehrung der Anzahl der Meßpunkte auch bei 25°C eine zweite Komponente des langsamen Zerfalls sichtbar gemacht werden, die bei einer Zerfallszeit von 110 Min. nicht aufgefallen war.

Theoretisch betrachtet, müßte die Lage der Schnittpunkte der Zerfallsgeraden der Einzelkomponenten durch Computeranalyse optimiert werden können. Ein solches Computerprogramm müßte mit der Methode der kleinsten Quadrate durch Optimierung des Bestimmtheitsmaßes r^2 den idealen Schnittpunkt der Zerfallsgeraden, der durch ein optimales r^2 beider Zerfallsgeraden gekennzeichnet wäre, auffinden. Wie diesbezügliche Modellberechnungen auf dem HP-25-Rechner mittels exponentieller Kurvenanpassung zeigten, müßte diese Methode auf ein Zweikomponentensystem mit Einschränkungen anwendbar sein, (vergl. Anhang I/2). Diese Einschränkungen sind, daß sich r^2 stetig

bis zum Schnittpunkt gegen 1 hin entwickelt, oder anders ausgedrückt, daß alle Quadrate der Einzelpunkte vergleichbar groß sind, was wiederum bedeutet, daß alle Meßpunkte einen ungefähr gleichen Abstand von der Meßgerade haben müßten. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, ergibt sich keine stetige Entwicklung von r^2 , so daß kein eindeutiger Schnittpunkt errechnet werden kann.

Ist diese Bedingung aber, wie im Beispiel für zwei Komponenten in Anhang I/2, erfüllt, kann man mittels exponentieller Kurvenanpassung von beiden Seiten der Meßpunktmenge her einen Bereich mit optimalem r^2 für beide Komponenten eingrenzen. Berechnet man die zugehörigen Zerfallsgeraden, ergibt sich der Schnittpunkt, der gut mit dem graphisch ermittelten Schnittpunkt übereinstimmt.

Ist die Bedingung einer stetigen Entwicklung von r^2 nicht erfüllt, weil Kurvenpunkte gelegentlich doch eine größere Streuung von der Zerfallsgeraden im Vergleich zur mittleren Streuung aufweisen, ist diese Methode nicht mehr anwendbar. Somit bietet eine Computerauswertung der Zerfallskinetiken keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der graphischen Auswertung. Ebenso verhält es sich bei den Zerfallskinetiken mit drei Komponenten. Im Beispiel in Anhang I/2 ließ sich die schnelle Komponente mittels Optimierung von r^2 ($r^2 = 0,9854$) eindeutig gegen die mittelschnelle Komponente in Übereinstimmung mit der graphischen Auflösung abgrenzen, nicht aber die langsame Komponente gegen die mittelschnelle. Dort wäre, wenn man r^2 kumulativ vom Ende der Zer-

fallsgeraden her (Zeit 230 Minuten) berechnet, das optimale r^2 mit 0,9033 bei der Zeit "40 Minuten" erreicht. Bei der graphischen Auswertung liegt der Schnittpunkt aber bei 100 Minuten. Ursache dafür ist, daß die Meßpunkte im Bereich des Schnittpunktes eine größere Streuung als die durchschnittliche aufweisen und r^2 somit negativ beeinflusst, so daß rechnerisch keine eindeutige Lagebestimmung des Schnittpunktes möglich ist.

Gleichzeitig zeigt diese Berechnung jedoch die Signifikanz der mittelschnellen Komponente, was durch den guten Wert für r^2 von 0,9823 dokumentiert wird, wenn man die Regression für die Punkte dieser Komponente von 20 bis 90 Min. berechnet. Die Steigung der Geraden beträgt -0,0097 im Gegensatz zur schnellen Komponente mit einer Steigung von -0,0309 bei einem r^2 von 0,9854. Nicht so deutlich ist der Unterschied zur langsamen Komponente mit einer Steigung von -0,0025 und einem r^2 von nur 0,7940. Dieser Wert wurde allerdings entscheidend durch die beiden Meßwerte bei 105 und 130 Min. beeinflusst, die durch eine weite Streuung als Ausreißer auffielen.

Somit zeigt sich auch zusammenfassend am Beispiel des Dreikomponentenmodells, daß eine Computeranalyse der Zerfallskurven nicht unbedingt eine verbesserte Genauigkeit der Auswertung zur Folge haben muß. Nachdem auch kein entsprechendes Programm erstellt oder beschafft werden konnte, wurden alle Zerfallskinetiken graphisch ausgewertet. Wie anhand ausgewählter Beispiele kontrolliert wurde, ergaben sich dabei im Vergleich zu mittels exponentieller Kurvenanpassung berech-

meter Zerfallskinetiken nur unwesentliche Unterschiede in den dabei erzielten Halbwertszeiten.

Nichtlineare und von 1 abweichende Hill-Koeffizienten bei Inhibitionsexperimenten erhält man bei Vorhandensein zweier oder mehrerer unabhängig voneinander besetzbaren Bindungsstellen, oder bei Vorliegen kooperativer Bindungsstellen (z.B.68). Magar und Chun (43) zeigten mittels Computeranalysen am klassischen Beispiel des Hämoglobins, daß bei Vorliegen von kooperativen Bindungsstellen der Hill-Koeffizient nicht linear ist, sondern sich als Funktion der Ligandenkonzentration beschreiben läßt. Die nichtlinearen Hill-Koeffizienten in vorliegender Arbeit können aber ganz einfach durch das Vorhandensein der verschiedenen, unabhängig voneinander bindenden Rezeptorstellen für d-LSD in der Gesamtmembranfraktion erklärt werden. Für diesen Fall sind selbstverständlich ebenfalls nichtlineare Hill-Koeffizienten zu erwarten, wie auch bereits durch Computeranalysen gezeigt wurde. Man kann also in vorliegendem Fall, d.h. in Gegenwart von verschiedenen Typen von Bindungsproteinen in der Gesamtmembranfraktion vom Vorliegen nichtlinearer Hill-Koeffizienten alleine noch nicht auf einen kooperativen Effekt der Betreffenden Substanz gegenüber der d-LSD-Bindung schließen. Nachdem aber in der Gesamtmembranfraktion alle d-LSD-bindenden Neurotransmitterrezeptoren vorhanden sind, erscheint es aber plausibel, die für etliche Substanzen gemessenen diskontinuierlichen Hill-Koeffizienten in den betreffenden Konzentrationsbereichen den einzelnen Rezeptortypen zuzuordnen. In diesen Teilbereichen entwickelt sich der Hill-Koeffizient linear mit der Konzentration

des verdrängenden Inhibitors und eine Abweichung von 1 würde dann auf kooperative Effekte hindeuten. Auf diese Weise wurden in vorliegender Arbeit erste Hinweise auf das Vorliegen von drei distinkten d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns gefunden, nachdem einige Substanzen drei gut voneinander unterschiedene Teilbereiche mit linearer Entwicklung des "Hill-Koeffizienten" bei den Inhibitionsexperimenten zeigten. Auch lieferten diese Untersuchungen erste Hinweise auf eine negativ kooperative Wirkung des Tryptamins mit einem "Hill-Koeffizienten" von nahezu zwei im Konzentrationsbereich von 30 bis 100 mM (vergl. Abb.5).

Nun wurde aber die Schlußfolgerung, daß ein Hill-Koeffizient kleiner als Eins auf negative Kooperativität schließen läßt, für den Fall getroffen, daß nur ein markierter Ligand mit den Bindungsstellen reagiert. Für den Fall, daß ein unmarkierter Ligand mit dem markierten Liganden um die Bindungsstelle konkurriert, kann man diesen Schluß nicht ohne weiteres übernehmen. Konkurriert nämlich ein unmarkierter Ligand um die Bindungsstellen, wird der Hill-Koeffizient dieser Verdrängung wesentlich von der Affinität dieses unmarkierten Liganden zu der Bindungsstelle abhängen. Ist die Affinität des unmarkierten Liganden zur Bindungsstelle größer als die des markierten, ist es aufgrund des Massenwirkungsgesetzes evident, daß der unmarkierte Ligand mit höherer Affinität die Bindungsstelle im Konkurrenzversuch unter Gleichgewichtsbedingungen zu einem höheren Prozentsatz besetzt, wie der markierte Ligand mit niedrigerer Affinität.

Auf diese Weise kann der Hill-Koeffizient auch kleiner als Eins werden. Ehlert et al (11) wiesen darauf hin, daß die IC_{50} und damit der Hill-Koeffizient bei Erreichen des Bindungsgleichgewichtes von dem Quotienten k_{-1}/k_{-2} der beiden Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls der beiden Liganden abhängig. Das bedeutet, daß man fälschlich kooperative Effekte in Versuchsergebnisse hineininterpretiert, wenn man die Verdrängungsstudien nicht unter echten Gleichgewichtsbedingungen durchführt. Auch Arányi (1) wies auf die Möglichkeit artifizieller Ergebnisse hin, falls Liganden mit langer Equilibrierungsdauer eingesetzt werden. In vorliegender Arbeit wurde bei allen Versuchen eine Inkubationsdauer von 90 Minuten eingehalten. Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde (32), ist bei 25°C in dieser Zeitspanne das Gleichgewicht der Bindung für [3H]-d-LSD erreicht, so daß auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 130 Min. keine signifikante Änderung der Gesamtbindung an [3H]-d-LSD erbrachte. Falls jedoch unmarkierte Liganden mit einer vergleichsweise langsameren Gleichgewichtseinstellung eingesetzt werden, wäre es denkbar, daß die Inhibitorkonstanten für diese Liganden gegenüber [3H]-d-LSD durch diesen Effekt verfälscht werden würden. Es zeigte sich jedoch bei den kinetischen Zerfallsversuchen für alle geprüften Substanzen, daß die Kontrollen, die vor Einleitung des Zerfalls dem Inkubationsgemisch entnommen wurden und über die gesamte Zerfallsdauer von bis zu maximal 120 Min. bei 25°C - was einer Gesamtinkubationsdauer von 180 Min. entspricht - weiter inkubiert wurden, keine signifikante Änderung der [3H]-d-LSD-Bin-

dung gegenüber dem Wert Null vor der Zerfallseinleitung aufwiesen. Demnach kann davon ausgegangen werden, daß für die verdrängenden Substanzen echte Gleichgewichtsbedingungen vorlagen. Gleichzeitig zeigten diese Kontrollen die gute Stabilität der [^3H]-d-LSD-Protein-Ligandenkomplexe in den untersuchten Membranfraktionen gegenüber proteolytischen und thermischen Einflüssen.

Die Existenz einer allosterisch regulierten oder einer sich kooperativ verhaltenden Bindungsstelle für Neurotransmitter oder speziell d-LSD ist schon seit längerem Gegenstand kontroverser Diskussion und es mangelte nicht an Bemühungen, die Frage nach Vorhandensein einer allosterischen Bindungsstelle für Serotonin respektive d-LSD im Gehirngewebe zu beantworten. Diese Versuche waren zum Einen theoretischer Natur, worunter die bereits zitierten Computeranalysen und Kurvenanpassungen über nichtlineare Hill-Koeffizienten (43) gehören, die teilweise auch im Dopamin-Rezeptor-System (2) und Beta-adrenergen System durchgeführt wurden (34), zum Anderen empirischer Natur mit dementsprechend geplantem experimentellem Ablauf unter Einbeziehung des putativen Effektors in die Bindungsstudien. So schlossen G. Fillon und M. Fillon (13) auf eine Konformationsänderung des Serotonin-Rezeptors in Präparationen Synaptischer Membranen des Striatums aus Pferdegehirn, weil nach Vorinkubation mit Serotonin eine zeitabhängige Steigerung der Affinität dieses Rezeptors zu tritiiertem Serotonin gezeigt werden konnte. Serotonin fungiert nach dieser Arbeit also als Effektor seines allosterisch regulierten Rezeptorproteins in Synaptischen

Membranen des Pferdestriatum. In der lysierten Fraktion Synaptischer Membranen des Rattengroßhirns wurde von Nelson et al (48) zwar ebenfalls ein Anstieg der Affinität zu markiertem Serotonin nach einer 10-minütigen Vorinkubation ohne Serotonin gefunden, von der Steigung des Hill-Koeffizienten her, der für Serotonin über den gesamten geprüften Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-7} M linear war und bei 0,94 lag, fand sich dagegen kein Hinweis auf eine kooperative Wirkung des 5-HT auf die Bindung radioaktiv markierten Serotonins. Der aktivierende Effekt der Vorinkubation wurde in dieser Arbeit als durch Abbau endogenen Serotonins bedingt betrachtet, was auch durch Messung des endogenen Serotoninspiegels vor und nach der Vorinkubation belegt werden konnte.

In vorliegender Arbeit konnte, wie bereits im Abschnitt "Ergebnisse" dargelegt wurde, keine signifikante Änderung der [3 H]-d-LSD-Bindung nach einer entsprechenden Vorinkubation über 30 Min. bei 37°C gefunden werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß während der Präparation der Gewebeproben interferierende endogene Liganden abgebaut worden waren. Gleichzeitig konnte durch diese einfachen Vorinkubationsexperimente ein direkter Hemmeffekt des Pargylins auf die [3 H]-d-LSD-Bindung nachgewiesen werden, nachdem die Hemmwirkung des Pargylins bei 10 mM Endkonzentration vor und nach der Vorinkubation unverändert war.

Bezüglich der kooperativen Wirkung des Serotonins auf Serotonin-Rezeptoren liegen also widersprüchliche Befunde vor.

Auf die Bindung von radioaktiv markiertem d-LSD als gemischtem Antagonisten und Agonisten des Serotonins (49) wirkt Serotonin nach den Ergebnissen der kinetischen Untersuchungen in vorliegender Arbeit sowohl in der Gesamtmembranfraktion als auch in der Fraktion Synaptischer Membranen verlängernd auf den Zerfall der langsamen Komponenten C des Zerfalls sowohl in der Isotopenverdünnungsmethode als auch in der Volumenverdünnungsmethode und zeigt somit einen kooperativen Effekt auf die d-LSD-Bindungsstelle an. Allerdings fanden sich auch Hinweise auf einen kooperativen Effekt des Tryptamins mit dessen verlängernder Wirkung auf die Halbwertszeit des Zerfalls der langsamen Komponente C der Gesamtmembranfraktion, so daß in dieser Fraktion des Rattengroßhirns mindestens jeweils eine auf 5-HT und auf Tryptamin kooperativ reagierende d-LSD-Bindungsstelle vorliegen dürfte. Ob es sich dabei um identische Bindungsstellen handelt, müßten weitere Studien zeigen.

Durch Messung der Aktivierungsenergien der Zerfallskomponenten konnte durch den Sprung der Aktivierungsenergie der mittelschnellen Zerfallskomponente bei 27°C ein eindeutiger Hinweis auf Vorliegen einer allosterisch regulierten Bindungsstelle gefunden werden, dessen Effektor nach den Ergebnissen der Zerfälle bei 37°C mit Tryptamin sowie dem steilen Anstieg des "Hill-Koeffizienten" in dem entsprechenden Konzentrationsbereich möglicherweise mit Tryptamin identisch ist. Die Ergebnisse der Zerfallsversuche deuten daraufhin, daß die schnelle Zerfallskomponente durch "aminerge" d-LSD-

Bindungsstellen verursacht wird, weil Dopamin und 5-MEOT sowie der Serotonin-Antagonist Cyproheptadin (51) die schnelle Komponente bevorzugt besetzt und auch Serotonin eine leichte, wenn auch statistisch nicht signifikante Bevorzugung der schnellen Zerfallskomponente zeigt. Auch Lisurid als dopaminerges Agonist im Striatum (17), das allerdings auch antagonistisch im Beta-adrenergen System wirkt (8), besetzt bevorzugt die "aminerge" schnelle Komponente A. Tryptamin nimmt eine Sonderstellung ein, weil es nach Tabelle 4 bevorzugt die langsame Komponente C besetzt. Dies ist aber nach den Ergebnissen der Zerfälle bei 37°C, bei denen die drei Komponenten des Zerfalls sichtbar gemacht werden konnten, hauptsächlich auf die quantitative Besetzung der mittelschnellen Zerfallskomponente B zurückzuführen, die ja bei 25°C in der langsamen Komponente mitenthalten ist und somit bei ihrer Absättigung eine Besetzung der langsamen Komponente vortäuscht. Auch die schwache, aber statistisch signifikante Verlängerung der Halbwertszeit der langsamen Komponente bei 4 nM unmarkierten d-LSD dürfte artifiziell bedingt sein, weil sich weder aus dem Hill-Koeffizienten noch aus den Zerfallsversuchen in der Volumenverdünnungsmethode ein Hinweis auf Kooperativität mit d-LSD ergab. Wahrscheinlich wurde auch hier in gleicher Weise wie bei Tryptamin die mittelschnelle Zerfallskomponente durch unmarkiertes d-LSD eliminiert und durch den Wegfall dieser Komponente die Halbwertszeit des Zerfalls scheinbar verlängert.

Auf den gleichen Effekt dürfte auch die verlängernde Wirkung von Serotonin und Tryptamin auf die langsame Zerfallskomponente C zurückzuführen sein, weil sich aus der Arrhenius-Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Zerfallskonstanten kein Hinweis auf eine Kooperativität der langsamen Komponente bei linearem Verlauf ihrer Zerfallskonstanten ergab. Somit dürfte die Halbwertszeit des langsamen Zerfalls nur scheinbar verlängert worden sein, wobei zwei Möglichkeiten denkbar sind: Entweder wurde die Halbwertszeit durch Elimination der mittelschnellen Zerfallskomponente B und dadurch bedingtem Wegfall deren kürzerer Halbwertszeit scheinbar verlängert, oder aber durch Verlängerung der Halbwertszeit der mittelschnellen, nach der Arrhenius-Darstellung kooperativen Bindungsstelle B, so daß die sich aus beiden Halbwertszeiten zusammensetzende Halbwertszeit der "langsamen" Komponente insgesamt verlängert erscheint.

Eine Kooperativität der langsamen Komponente C erscheint also aus dieser Befundkonstellation fraglich und ist nach dem Ergebnis der Untersuchung zur Aktivierungsenergie (Arrhenius-Darstellung) eher zu verneinen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Zerfall mit Serotonin in der Volumenverdünnungsmethode (Tabelle 6), daß durch Serotonin selektiv die langsame Zerfallskomponente C verlängert wurde und gleichzeitig die mittelschnelle Komponente B in ihrer Halbwertszeit unverändert blieb. Auch war die mittelschnelle Komponente bei halbmaximaler Besetzung der Bindungsstellen mit Serotonin nicht vollständig abgesättigt, wie beim

analogen Experiment mit Tryptamin in der Isotopenverdünnungsmethode. Somit ergaben sich also aus diesem Experiment wiederum Hinweise auf kooperative Wirkung des Serotonins auf die langsame Zerfallskomponente C, aber nicht auf eine solche Wirkung auf die mittelschnelle B. Allerdings waren dies nur 2 Experimente, so daß dieses Ergebnis nur als Vorversuch zu betrachten ist. Zusammenfassend dürfte jedoch wenigstens eine Population von kooperativ regulierten [^3H]-d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns vorliegen, wobei es sich um die Bindungsstellen mit der mittelschnellen Halbwertszeit des Zerfalls (B) handeln dürfte. Zusätzlich könnte die langsame Zerfallskomponente C ebenfalls allosterisch reguliert sein, wofür die Verlängerung der Halbwertszeit dieser Komponenten unter Serotonin spricht. Wie oben beschrieben, fand sich zwar aus der Arrhenius-Darstellung kein Hinweis auf eine Kooperativität der langsamen Zerfallskomponenten C, andererseits muß dieses Verhalten beim Studium der Aktivierungsenergien des Zerfalls mit linearer Entwicklung der Aktivierungsenergie über einen größeren Temperaturbereich nicht unbedingt gegen Vorliegen einer allosterisch regulierten oder kooperativen Bindungsstelle sprechen.

Bezüglich der differenziellen Besetzung der Zerfallskomponenten wurden prinzipiell identische Ergebnisse sowohl mit der Isotopen- als auch mit der Volumenverdünnungsmethode in der Gesamtmembranfraktion und mit der Isotopenverdünnungsmethode in der Fraktion Synaptischer Membranen gewonnen:

Die schnelle Komponente wurde bevorzugt von den Aminen besetzt, wobei in der Fraktion Synaptischer Membranen sogar eine quantitative Besetzung dieser Komponente durch Serotonin bei einer Endkonzentration von 160 nM möglich war, während die Lysergsäureamid-Derivate bevorzugt die langsamen Komponenten besetzten. Somit dürfte die schnelle Zerfallskomponente in engerer Relation zu den gesuchten Neurotransmitter-Rezeptoren stehen als die langsamen. Allerdings wurde die langsame Komponente, die, wie oben beschrieben aus zwei Unterpopulationen der mittelschnellen Komponente B und der langsamen C besteht, erst mit Tryptamin in der Isotopen-Verdünnungsmethode differenziert untersucht. Entsprechende Versuche mit den anderen Neurotransmittern stehen noch aus.

Aus methodischen Gründen erscheint es aber eher unwahrscheinlich, daß mit der Volumenverdünnungsmethode die Auflösung in drei Zerfallskomponenten gelingt, weil die nach der Verdünnung zur Einleitung des Zerfalls entstehenden Volumina eine größere Ungenauigkeit des einzelnen Meßwertes bewirken. So müssen für einen Meßwert zehn Milliliter Inkubationsgemisch möglichst rasch in einer Pipette aufgezogen und filtriert werden. Benützt man eine 5 Milliliter Kolbenpipette, muß man bereits zweimal aufziehen. Dieses Aufziehen kann nicht beliebig schnell erfolgen, weil sonst durch Luftblasenbildung weniger entnommen wird. Dabei sind die großvolumigen Pipetten konstruktionsbedingt bereits ungenauer wie die kleinvolumigen. Zusätzlich sind die Adsorptionsphänome wegen der größeren benetzten Oberfläche in der großvolumigen Pipette gra-

vierender und könnten tatsächlich eine Verschiebung der freien [^3H]-d-LSD-Konzentration im Testgemisch bewirken. Dazu kommt noch die Ungenauigkeit bei der rechnerischen Restbindungskorrektur, die bei einer 1:20-Verdünnung notwendig ist. Eine hundertfache Verdünnung, wie sie nach Literaturangaben (68) anzustreben ist und bei der man die Restbindung vernachlässigen könnte, kann aus den oben beschriebenen technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Für einen Einzelwert hätten dann 50 ml Inkubationsmedium filtriert werden müssen, was wegen der großen Störeinflüsse wenig sinnvoll wäre.

Wie im Abschnitt "Ergebnisse" beschrieben, gelang eine Auflösung in drei Zerfallskomponenten nur bei den Zerfällen mit Serotonin im Verdünnungsmedium, was wahrscheinlich auf zufällig optimale Versuchsbedingungen zurückzuführen sein dürfte.

Nachdem Substanzen mit einer hundertprozentigen Rezeptorspezifität, wie sie für derartige Versuche ideal wären, nicht bekannt sind, dürfte für die Methodik der Zerfallsuntersuchungen die irreversible Rezeptorblockade durch Phenoxybenzamin ein bedeutender Fortschritt zur Identifikation von Rezeptoren darstellen. Durch schrittweise, weil wahrscheinlich zeit- und konzentrationsabhängige Blockade (44) von Bindungsstellen durch Phenoxybenzamin sollte es möglich sein, die verbleibenden Rezeptoren mittels ihrer pharmakologischen Spezifität den infragekommenden Neurotransmitter-Rezeptoren zu-

zuordnen. In vorliegender Arbeit konnten mit dieser Blockade-
detektechnik die drei aus der Zerfallskinetik bekannten Kompo-
nenten den in den thermodynamischen Experimenten nachweis-
baren d-LSD-Bindungskomponenten zugeordnet werden. Phenoxy-
benzamin ist seit längerer Zeit als irreversibel blockie-
rendes Agens von Alpha-adrenergen Rezeptoren bekannt (25),
wurde zur Blockade von Serotoninrezeptoren im Rattenuterus
verwendet (65), zur Blockade von Opiatrezeptoren herangezo-
gen (58) und wurde erst in jüngerer Zeit wieder zur Diffe-
renzierung von Dopamin-Rezeptoren eingesetzt (21,44).

In letzter Zeit sind Substanzen synthetisiert worden, die
eine hohe Rezeptorspezifität besitzen und somit für die Ab-
sättigung der entsprechenden Bindungsstellen in den Zerfalls-
versuchen den Idealvorstellungen sehr nahekommen. Es handelt
sich dabei um Mianserin (39,50), das allerdings auch Hista-
min H_1 -Rezeptoren besetzt (50) und Ketanserin (37,40,41),
das hochspezifisch S_2 -Serotoninrezeptoren besetzt (29,30,
41). Diese Substanzen konnten in vorliegenden Experimenten
noch nicht berücksichtigt werden, weil sie entweder noch
nicht verfügbar oder nicht bekannt waren. Mit diesen Sub-
stanzen müßten jedoch weitere Zerfallsversuche durchgeführt
werden, wobei wegen der hohen Rezeptorspezifität dieser Sub-
stanzen die Identifikation der entsprechenden, von diesen
Substanzen markierten Rezeptoren in der Gesamtheit der d-LSD-
bindenden Proteine wesentlich erleichtert sein dürfte.

Zusammenfassend konnte durch die Anwendung der kinetischen Zerfallsmethode trotz Vorliegen multipler Bindungsstellen für [^3H]-d-LSD in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns auch ohne Präparation definierter Gehirnnareale drei Bindungskomponenten nebeneinander nachgewiesen werden und aminergen und ergot-derivat-bezogenen Bindungsstellen zugeordnet werden. Natürlich ist dieses Verfahren prinzipiell der gehirn-topographisch ausgerichteten Untersuchung der [^3H]-d-LSD-Bindung unterlegen, weil durch die Differenzierung in Gehirnnareale bereits eine wesentliche Anreicherung der einzelnen d-LSD-bindenden Rezeptorentypen möglich ist. So konnte zwischenzeitlich gesichert werden, daß d-LSD im Kortex hauptsächlich Serotonin-Rezeptoren besetzt und im Striatum hauptsächlich Dopamin-Rezeptoren markiert, wobei inzwischen auch Rezeptorsubtypen unterschieden werden. Wie bereits in der Einleitung dargelegt, war diese topographische Verteilung der d-LSD-bindenden Rezeptoren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Weitere kinetische Untersuchungen sollten jedoch zwischen kortikalen Gehirnnarealen und solchen des Striatums differenzieren.

Obwohl der analytische Wert von subzellulären Fraktionierungen in Rezeptorstudien nicht überbewertet werden sollte (36), konnte in vorliegender Arbeit eine streng fraktionsspezifische Hemmwirkung von Kalziumchlorid auf die [^3H]-d-LSD-Bindung in der Fraktion Synaptischer Membranen des Rattengroßhirns nachgewiesen werden.

Demgegenüber wurde die [^3H]-d-LSD-Bindung in mikrosomalen Membranen durch Kalziumchlorid und durch Magnesiumchlorid aktiviert, was seinerseits wiederum keinen Effekt auf die Bindung in Synaptischen Membranen hatte. Dieser Befund steht in Widerspruch zu Ergebnissen von Fillon (14), die keinen Effekt von Kalziumchlorid sowohl auf die Bindung von markiertem LSD als auch von markiertem Serotonin im identischen Konzentrationsbereich von Kalziumchlorid fanden. Natrium dagegen verminderte die Bindung der markierten Liganden wie in vorliegender Arbeit. Zwar war in dem betreffenden Artikel keine Tierspezies angegeben, doch dürfte es sich um Synaptische Membranen des Rattengroßhirns gehandelt haben.

Einen aktivierenden Effekt von Kalziumchlorid auf die Serotoninbindung in Synaptischen Membranen bei gleichzeitiger Unwirksamkeit von Magnesiumchlorid fanden Nelson et al (48), in deren Untersuchung die Bindung von 5-HT bei $4,0 \mu\text{M}$ Kalziumchlorid um 33% der Kontrolle aktiviert wurde.

Möglicherweise wird die Bindung des Agonisten Serotonin durch Kalziumchlorid aktiviert und die Bindung des Antagonisten d-LSD durch Kalziumchlorid gehemmt. Leider konnte in den Zerfallsversuchen mit Synaptischen Membranen unter Kalziumhemmung kein bevorzugter Angriffspunkt dieser Hemmung unter den beiden nachweisbaren Komponenten gefunden werden: Die [^3H]-d-LSD-Bindung wurde um fast den gleichen Prozentsatz zwischen 22 und 20% vermindert, so daß beide Komponenten gleichermaßen Kalziumchlorid-empfindlich zu sein schei-

nen. Entsprechend den Befunden der Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen in der Gesamtmembranfraktion, wo unter Kalziumaktivierung keine Änderung der apparenten Gleichgewichtskonstanten vorlag, sondern durch Kalziumchlorid lediglich die apparente Konzentration der Bindungsstellen verändert wurde, wurde auch im kinetischen Experiment die Halbwertszeit des Zerfalls in Anbetracht der großen Standardabweichung bei der Kontrolle nur unwesentlich verlängert und ist somit als nicht verschieden von der Kontrolle zu betrachten. Somit dürfte Kalziumchlorid keinen Einfluß auf die Affinität der [^3H]-d-LSD-Bindungsproteine ausüben, sondern die apparente Konzentration dieser Bindungsstellen verändern.

5. Zusammenfassung

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen war es mit thermodynamischen Methoden möglich, maximal zwei hochaffine d-LSD-Bindungsstellen in der Gesamtmembranfraktion des Rattengroßhirns mit einer $K_{D1} = 1,6 \text{ nM}$ und $K_{D2} = 57,0 \text{ nM}$ sichtbar zu machen. Mittels kinetischer Untersuchungsmethoden konnten in dieser Fraktion drei Typen hochaffiner d-LSD-Bindungsproteine A, B und C nachgewiesen werden. Sie lassen sich charakterisieren durch die Halbwertszeiten der Dissoziation des gebundenen radioaktiv markierten d-LSD von diesen Bindungsstellen. Typ A wird durch eine Halbwertszeit zwischen 3 und 10 Min., Typ B durch eine Halbwertszeit zwischen 20 und 60 Min. und Typ C durch eine Halbwertszeit von 100 Min. und darüber gekennzeichnet (25°C).

Mittels differenzieller Besetzung dieser d-LSD-Bindungsstellen durch unmarkierte Pharmaka konnten Hinweise auf die Identität dieser Rezeptorproteine gefunden werden, da die schnell dissozzierende Komponente A bevorzugt von den Aminen Serotonin, 5-Methoxytryptamin und Dopamin und die langsam zerfallende Komponente C durch Lysergsäurediäthylamid-Derivate besetzt wurde. Tryptamin besetzte in einer Konzentration von $30 \text{ }\mu\text{M}$ quantitativ die Komponente B. In der Fraktion Synaptischer Membranen, in der nur die zwei Komponenten A und C nachweisbar waren, war eine quantitative Besetzung der Komponente A durch 160 nM Serotonin möglich.

Es fanden sich Hinweise auf eine Kooperativität der Komponente B bei nichtlinearem Verlauf der Aktivierungsenergie des Komplex-Zerfalls in der Arrhenius-Darstellung. Die Aktivierungsenergien waren 7,6 Kcal für die Komponente A, 18,7 Kcal unterhalb von 27°C und 5,5 Kcal oberhalb dieser Sprungtemperatur für die Komponente B sowie 10,8 Kcal für die Komponente C. Es fanden sich ferner Hinweise auf eine kooperative Wirkung des Tryptamins mit einem "Hill-Koeffizienten" von 2 im Konzentrationsbereich von 30 bis 100 μM in den Verdrängungsstudien. Für d-LSD kann eine kooperative Wirkung ausgeschlossen werden.

Weitere Evidenzen für die Existenz des LSD-Bindungsproteins Typ B wurden durch Experimente erhalten, bei denen es gelang, die Bindungsstellen vom Typ A und C durch irreversible Reaktion mit Phenoxybenzamin weitgehend auszuschalten. Dadurch wurden die Voraussetzungen geschaffen für künftige pharmakologische Untersuchungen der Komponente B im Membranverband.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Arányi P.; Kinetics of the Hormone-Receptor Interaction: Competition Experiments with Slowly Equilibrating Ligands. *Biochem. Biophys. Acta* 628, 220-227 (1980).
- (2) Beld A.J., Kuijter B., Rodrigues de Miranda J.F. and Wouterse A.C.: Ligand Binding to Dopamine-Receptors: Analysis and Interpretation. *Life Sci.* 23, 489-494 (1978).
- (3) Bennett J.P. jr. and Snyder S.H.: Serotonin and Lysergic Acid Diethylamide Binding in Rat Brain Membranes: Relationship to Postsynaptic Serotonin Receptors. *Molec. Pharmacol.*, 12, 373-389 (1976).
- (4) Bennett J.P. jr. and Snyder S.H.: Stereospecific Binding of D-Lysergic Acid Diethylamide (LSD) to Brain Membranes: Relationship to Serotonin Receptors. *Brain Res.*, 94, 523-544 (1975).
- (5) Brüning G. and Rommelspacher H.: High Affinity (^3H)-Tryptamine Binding Sites in Various Organs of the Rat. *Life Sci.* 34, 1441-1446 (1984).
- (6) Cheng Y.C. and Prusoff W.H.: Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor with Causes 50 Percent Inhibition (IC_{50}) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108 (1973).
- (7) Closse A. and Hauser D.: Dihydroergotamine Binding to Rat Brain Membranes. *Life Sci.*, 19, 1851-1864 (1976).
- (8) Cote T., Munemura M. and Kebejian J.: Lisuride Hydrogen Maleate: An Ergoline with β -Adrenergic Antagonist Activity. *Europ. J. Pharmacol.* 59, 303-306 (1979).
- (9) Creese J., Prosser T. and Snyder S.H.: Dopamine Receptor Binding: Specificity, Localization and Regulation by Ions and Guanyl Nucleotides. *Life Sci.* 23, 495-500 (1978).

- (10) Dwoskin L.P. and Sparber S.R.: Behaviorally Inactive Doses of Mianserin Antagonize the Suppressant Effect of Lysergic Acid Diethylamide on a Fixed-Ratio Operant. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225, 77-84 (1983).
- (11) Ehler F.J., Roeske W.R. and Yamamura H.I.: Mathematical Analysis of the Kinetics of Competitive Inhibition in Neurotransmitter Receptor Binding Assays. *Molec. Pharmacol.* 19, 367-371 (1981).
- (12) Ferrini R. and Glässer A.: Antagonism of Central Effects of Tryptamine and 5-Hydroxytryptophan by 1,6-Dimethyl-8 β -Carbo-benzyloxy-Aminomethyl-10 α -Ergoline. Interference with Amphetamine and DOPA. *Psychopharmacologia (Berl.)* 8, 271-276 (1965).
- (13) Fillon G. and Fillon M.-P.: Transitional States of the Neuronal Serotonergic Site. *Europ. J. Pharmacol.* 65, 109-112 (1980).
- (14) Fillon G., Goigny M., Fillon M.-P. and Jacob J.: Influence d'ions et de divers réactifs de protéines sur les liaisons de haute affinité de la 5-hydroxytryptamine et du diéthylamide de l'acide lysergique par des membranes synaptosomales de cerveau. *J. de Pharmacol. (Paris)* 9, 183-184 (1978).
- (15) Fillon G., Rouselle J.C., Beaudoin D., Pradelles P., Goigny M., Dray F. and Jacob J.: Serotonin sensitive Adenylate Cyclase in Horse Brain Synaptosomal Membranes. *Life Sci.* 24, 1813-1822 (1979).
- (16) Fischel S.V. and Medzihradsky F.: Scatchard Analysis of Opiate Receptor Binding. *Molec. Pharmacol.* 20, 269-279 (1981).
- (17) Fujita N., Saito K., Yonehara N., Watanabe Y. and Yoshida H.: Binding of ³H-Lisuride Hydrogen Maleate to Striatal Membranes of Rat Brain. *Life Sci.* 25, 969-974 (1979).
- (18) Fuxe K., Ögren S.-O., Agnati L.F. and Jonsson G.: Further Evidence that Methergoline is a central 5-Hydroxytryptamine Receptor Blocking Agent. *Neurosci. Lett.* 9, 195-200 (1978).

- (19) Ganong W.F.: Lehrbuch der Medizinischen Physiologie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 3. Aufl., 681 (1974).
- (20) Garan L., Govoni S., Stefanini E., Trabucchi M. and Spano P.F.: Dopamine Receptors: Pharmacological and Anatomical Evidences indicate that two distinct Dopamine Receptor Populations are Present in Rat Striatum. *Life Sci.* 23, 1745-1750 (1978).
- (21) Hamblin M.W. and Creese I.: Phenoxybenzamine treatment Differentiates Dopaminergic ^3H -Ligand Binding Sites in Bovine Caudate Membranes. *Molec. Pharmacol.* 21, 44-51, (1982).
- (22) Hamblin M.W., Leff S.E. and Creese I.: Interactions of Agonists with D-2-Dopamine Receptors: Evidence for a single Receptor Population Existing in Multiple Agonist Affinity-States in Rat Striatal Membranes. *Biochem. Pharmacol.* 33, 877-887 (1984).
- (23) Hamon M., Bourgoin S., El Mestikawy and Goetz C.: Central Serotonin Receptors. *Handbook of Neurochemistry*, (Ed. A. Lajtha), 2nd Ed. 6, 107-143 Plenum Press New York, London (1982).
- (24) Hamon M., Mallat M., Herbert A., Nelson D.L., Audinot M., Pichot L. and Glowinski J.: ^3H -Metergoline: A New Ligand of Serotonin Receptors in the Rat Brain. *J. Neurochem.* 36, 513-626 (1980).
- (25) Harvey S.C. and Nickerson M.: Reactions of Dibenamide and some Congeners with Substances of Biological Interest in Relation to the Mechanism of Adrenergic Blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 112, 274-290 (1954).
- (26) Hofstee B.H.J.: On the Evaluation of the Constants V_m and K_M in Enzyme Reactions. *Science* 116, 329-331 (1952).
- (27) V. Hungen K., Roberts S. and Hill D.F.: LSD as an Agonist and Antagonist of Central Dopamine Receptors. *Nature* 252, 588-589 (1974).

- (28) v. Hungen K., Roberts S. and Hill D.F.: Serotonin-Sensitive Adenylate Cyclase Activity in Immature Rat Brain. *Brain Res.* 84, 257-267 (1975).
- (29) Ilie B., Garissen H. and Laduron P.M.: Characterisation of Solubilized Serotonin (S_2) Receptors in Rat Brain. *Molec. Pharmacol.* 22, 243-249 (1982).
- (30) Ilie B.A., Schotte A. and Laduron P.M.: Solubilized Serotonin Receptors from Rat and Dog Brain: Selective Labelling with 3H -Ketanserin. *FEBS Lett.* 138, 311-315 (1982).
- (31) Jones D.H. and Matus A.I.: Isolation of 'Synaptic Plasma Membrane' from Brain by Combined Flotation-Sedimentation Density Gradient Centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta*, 356, 276-287 (1974).
- (32) Kaiser H.O.: Nachweis der Heterogenität hochaffiner d-LSD-Serotonin-Bindungsproteine im zentralen Nervensystem der Ratte unter Anwendung eines optimierten Testverfahrens. Diplomarbeit München (1975).
- (33) Keabian J.W. and Calne D.B.: Multiple Receptors for Dopamine. *Nature* 277, 93-96 (1979).
- (34) Kent R.S., De Lean A. and Lefkowitz R.J.: A Quantitative Analysis of Beta-Adrenergic Receptor Interactions: Resolution of High- and Low Affinity States of the Receptor by Computer Modeling of Ligand Binding Data. *Molec. Pharmacol.* 17, 14-23 (1980).
- (35) Krueger B.K., Ratzlaff R.W., Strichartz G.R. and Blaustein M.P.: Saxitoxin Binding to Synaptosomes, Membranes and Solubilized Binding Sites from Rat Brain. *J. Membrane Biol.* 50, 287-310 (1979).
- (36) Laduron P.M.: Criteria for Receptor Sites in Binding Studies. *Biochem. Pharmacol.* 33, 833-839 (1984).

- (37) Leysen J.E., Awouters F., Kennis L., Laduron P.M., Vandenberg J. and Janssen P.A.J.: Receptor Binding Profile of R 41 468, a Novel Antagonist at 5-HT₂ Receptors. *Life Sci.* 28, 1015-1022 (1981).
- (38) Leysen J.E. and Gommeren W.: Different Kinetic Properties of Neuroleptic Receptor Binding in the Rat Striatum and Frontal Cortex. *Life Sci.* 23, 447-452 (1978).
- (39) Leysen J.E., Gommeren W. and Laduron P.M.: Distinction between Dopaminergic and Serotonergic Components of Neuroleptic Binding Sites in Limbic Brain Areas. *Biochem. Pharmacol.* 28, 447-448 (1979).
- (40) Leysen J.E., Niemegeers J.E., Van Nueten J.M. and Laduron P.M.: (³H)-Ketanserin (R 41 468), a selective ³H-Ligand for Serotonin S₂ Receptor Binding Sites. Binding Properties, Brain Distribution and Functional Role. *Molec. Pharmacol.* 21, 301-314 (1981).
- (41) Leysen J.E., Verwimp M., Geerts R., Gommeren W. and Laduron P.M.: Detailed Localization of 5-Hydroxytryptamine₂ Receptors investigated with ³H-Ketanserin, a new Selective Ligand. *Neurosci. Abstract* 6.3, 7 (1981).
- (42) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- (43) Magar M.E. and Chun P.W.: Relationship between Hill Plots with Variable Exponents and Determination of Average Free Energy of Interaction per Site. *Biophys. Chem.* 1, 11-17 (1973).
- (44) Marchais D. and Bockaert J.: Is there a Connection between High Affinity ³H-Spiperone Binding Sites and DA-Sensitive Adenylate Cyclase in Corpus Striatum? *Biochem. Pharmacol.* 29, 1331-1336 (1980).
- (45) Marshall A.G.: *Biophysical Chemistry*. J. Wiley & Sons, New York (1978).

- (46) Mehl E.: Molecular Properties of a Putative Serotonin Receptor Protein of Nerve-Ending-Membranes. *Exp. Brain Res.*, Sup. 23, 139 (1975).
- (47) Mehl E. and Weber L.: Affinity Chromatography for Subfractionation of 5-HT-LSD-Binding Proteins from Cerebral and Nerve-Ending-Membranes. *Adv. Biochem. Psychopharm.* 11, 105-108 (1974).
- (48) Nelson D.L., Herbet A., Bourgoïn S., Glowinski J. and Hamon M.: Characteristics of Central 5-HT Receptors and their Adaptive Changes following intracerebral 5,7-Dihydroxytryptamine Administration in the Rat. *Molec. Pharmacol.* 14, 983-995 (1978).
- (49) Peroutka S.J., Lebovitz R.M. and Snyder S.H.: Serotonin Receptor Binding Sites Affected Differentially by Guanine Nucleotides. *Molec. Pharmacol.* 16, 700-708 (1979).
- (50) Peroutka S.J. and Snyder S.H.: ³H-Mianserin: Differential Labeling of Serotonin₂ and Histamine₁ Receptors in Rat Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216, 142-148 (1980).
- (51) Peroutka S.J. and Snyder S.H.: Multiple Serotonin Receptors: Differential Binding of (³H)-5-Hydroxytryptamine, (³H)-Lysergic Acid Diethylamide and (³H)-Spiroperidol. *Molec. Pharmacol.* 16, 687-699 (1979).
- (52) Pert C.B. and Snyder S.H.: Properties of Opiate-Receptor Binding in Rat Brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 70, 2243-2247 (1973).
- (53) Pieri L., Pieri M. and Haefely W.: LSD as an agonist of Dopamine Receptors in the Striatum. *Nature* 252, 586-588 (1974).
- (54) Prémont J., Tassin J.P., Thierry A.M. and Bockert J.: Repartition and Drug Sensitivity of Dopamine and L-Isoproterenol-Sensitive Adenylate Cyclases in Rat Brain Homogenates. *Adv. Biochem. Psychopharm.* 15, 347-356 (1976).
- (55) Quayle E.S., Pagel J., Monti J.A. and Christian S.T.: A Serotonin sensitive Guanylate Cyclase Associated with Specific Neurotransmitter Binding Sites on isolated Synaptic Membranes from Mature Rat Brain. *Life Sci.* 23, 159-166 (1978).

- (56) Quock R.M. and Weick B.G.: Tryptamin-induced drug Effects insensitive to Serotoninergeric Antagonists: Evidence of Specific Tryptaminergic Receptor Stimulation? J. Pharm. Pharmacol. 30, 280-283 (1978).
- (57) Rauen H.M.: Biochemisches Taschenbuch. Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York. Zweite Auflage (1964).
- (58) Robson L.E. and Kosterlitz H.W.: Specific Protection of the Binding Sites of D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin (S-Receptors) and Dihydromorphine (μ -Receptors). Proc. R. Soc. Lond. B 205, 425-432 (1979).
- (59) Rogawski M.A. and Aghajanian G.K.: Response of Central Monoaminergic Neurons to Lisuride: Comparison with LSD. Life Sci. 24, 1289-1298 (1979).
- (60) Rosenthal H.E.: A Graphic Method for the Determination and Presentation of Binding Parameters in a Complex System. Anal. Biochem. 20, 525-532 (1967).
- (61) Scatchard G.: The Attractions of Proteins for small Molecules and Ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949).
- (62) Schmid R. and Sapunov V.N.: Non-Formal Kinetics. Monographs in Modern Chemistry 14, (Series Ed.: H.F. Ebel), Verlag Chemie Weinheim, Basel (1982).
- (63) Snyder S.H. and Goodman R.R.: Multiple Neurotransmitter Receptors. J. Neurochem. 35, 5-15 (1980).
- (64) Stolzki B., Kaiser H.O. and Mehl E.L.: Heterogeneity of LSD-Displacing Factors and Multiple Types of High Affinity LSD-Binding Sites. Life Sci. 23, 593-598 (1978).
- (65) Takayanagi I., Liao C.S. and Takagi K.: Effects of Calcium Ions and Magnesium Ions on 5-Hydroxytryptamine-Receptor Interaction. Japan. J. Pharmacol. 26, 383 (1976).

- (66) Whitaker P.M. Seeman P.: Selective Labeling of Serotonin Receptors by D-(³H)-Lysergic Acid Diethylamide in Calf Caudate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, No. 12, 5783-5787 (1978).
- (67) Wreggett K.A. and Seeman P.: Agonist High- and Low-Affinity States of the D-2-Dopamine Receptor in Calf Brain. Molec. Pharmacol. 25, 10-17 (1983).
- (68) Yamamura H.I., Enna S.J. and Kuhar M.J.: Neurotransmitter Receptor Binding. Raven Press New York (1978).

Außerdem:

Programmsammlung zum HP-25-Rechner, Ausgabe 1975.

Anhang I

Regressionsanalyse zur Optimierung der Zerfallsgeraden

- 1) Zweikomponentensystem
- 2) Dreikomponentensystem

Auf dem HP-25-Rechner wurden mittels Programm "exponentielle Kurvenanpassung" von beiden Seiten der empirisch gewonnenen Werte der Zerfallsgeraden kumulativ die Steigung b sowie das zugehörige Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet. Dabei entwickelt sich das Bestimmtheitsmaß r^2 auf einen optimalen, d.h. also auf einen möglichst wenig von 1,0 verschiedenen Wert zu. In der ersten Spalte ist die Entwicklung von r^2 von Zeit 1 Minute her, in Spalte zwei die Entwicklung von r^2 von Zeit 95 Minuten im Zweikomponentensystem bzw. 250 Minuten im Dreikomponentensystem her aufgelistet. Es ergibt sich beim Zweikomponentensystem (I/1) ein Bereich eines optimalen r^2 für beide Komponenten. Berechnet man die zugehörigen Zerfallsgeraden, ergibt sich der gesuchte Schnittpunkt.

Im Dreikomponentensystem wurde prinzipiell gleich verfahren. Das Bestimmtheitsmaß r^2 für die mittelschnelle Komponente B wurde in Spalte 3 gesondert berechnet und zeigt ein optimales r^2 von 0,9823. In Spalte 3 sind gleichzeitig kumulativ berechnete r^2 -Werte für die zusätzlich in die mittlere Komponente einbezogenen Werte für 105, 130 und 150 Min. angegeben. Vergleiche Abschnitt Diskussion.

Statistische Versuche zur Optimierung der Zerfallsgerten über das Bestimmtheitsmaß r^2
 an einem ausgewählten Beispiel: Zweikomponentensystem.

x-t (Min.)	hochaffine Bindung Meßwert IpM	Ordinaten- abschnitt a	Steigung b	r^2	Ordinaten- abschnitt a	Steigung b	r^2
1	315	-	-	-	271,57	-0,0203	0,9785
2	292	339,80	-0,0758	1,0000	265,30	-0,0200	0,9798
3	285	328,30	-0,0500	0,9187	259,70	-0,0196	0,9800
4	275	324,59	-0,0432	0,9395	252,66	-0,0192	0,9810
5	265	322,91	-0,0406	0,9610	250,18	-0,0191	0,9786
10	234	314,60	-0,0310	0,9641	240,37	-0,0185	0,9800
15	195	315,50	-0,0318	0,9880	229,20	-0,0178	0,9838
20	165	316,10	-0,0323	0,9944	220,92	-0,0173	0,9848
25	145	314,95	-0,0316	0,9962	216,16	-0,0169	0,9827
30	128	313,26	-0,0307	0,9963	213,62	-0,0168	0,9788
35	110	312,35	-0,0303	0,9971	214,69	-0,0169	0,9739
40	114	306,24	-0,0280	0,9819	226,79	-0,0176	0,9769
45	100	302,40	-0,0267	0,9793	223,92	-0,0174	0,9700
50	94	298,17	-0,0254	0,9754	229,43	-0,0177	0,9628
55	88	293,94	-0,0243	0,9716	231,56	-0,0178	0,9504
60	84	289,70	-0,0231	0,9666	226,32	-0,0175	0,9292
65	68	288,23	-0,0229	0,9717	194,78	-0,0158	0,9061
70	64	286,30	-0,0225	0,9745	213,47	-0,0168	0,8809
75	64	282,72	-0,0218	0,9726	244,71	-0,0184	0,8460
80	57	280,17	-0,0213	0,9735	174,11	-0,0146	0,6931
85	48	279,36	-0,0212	0,9769	67,43	-0,0043	0,2392
90	44	278,41	-0,0210	0,9796	19,77	-0,0089	1,0000
95	46	275,23	-0,0205	0,9782	-	-	-

t (Min.)	Meßwert		Steigung b	r^2	Ordinaten- abschnitt		Steigung b	r^2
	IpM	abschnitt a			a	b		
1	415	-	-	-	306,21	-0,0070	0,8629	
2	403	427,36	-0,0293	1,0000	297,08	-0,0068	0,8644	
3	393	426,16	-0,0272	0,9979	287,14	-0,0066	0,8671	
4	360	439,09	-0,0452	0,9047	276,02	-0,0063	0,8725	
5	365	431,94	-0,0370	0,8865	265,57	-0,0061	0,8750	
10	313	425,59	-0,0315	0,9597	251,97	-0,0057	0,8885	
15	268	424,70	-0,0309	0,9854	240,61	-0,0054	0,8966	
20	247	419,61	-0,0280	0,9831	232,12	-0,0052	0,8953	Regression der Zerfalls- geraden zwischen $t=20$ Min. und $t=90$ Min.
25	240	411,79	-0,0244	0,9617	223,92	-0,0049	0,8913	
30	227	405,35	-0,0218	0,9506	213,23	-0,0046	0,8930	
40	192	399,25	-0,0199	0,9547	200,56	-0,0043	0,9033	$a = 296,52$
50	175	391,76	-0,0180	0,9509	191,77	-0,0040	0,8992	$b = -0,0097$
60	163	384,04	-0,0162	0,9439	183,27	-0,0037	0,8916	$r^2 = 0,9823$
70	153	376,73	-0,0143	0,9370	173,61	-0,0034	0,8847	
80	133	372,43	-0,0140	0,9441	161,48	-0,0030	0,8895	
90	129	371,03	-0,0138	0,9525	154,99	-0,0028	0,8576	mit zusätzlichen Werten von 105, 130 und 150 Min.
105	118	368,81	-0,0134	0,9580	146,25	-0,0025	0,7940	$r^2 = 0,9776$
130	95	367,37	-0,0133	0,9659	132,28	-0,0020	0,6536	$r^2 = 0,9823$
150	108	353,02	-0,0117	0,9292	165,12	-0,0031	0,9143	$r^2 = 0,9232$
170	94	341,55	-0,0106	0,9114	135,87	-0,0021	0,9889	
190	91	323,12	-0,0090	0,8653	140,39	-0,0023	0,9829	
210	86	310,91	-0,0080	0,8436	124,86	-0,0018	1,0000	
230	83	301,52	-0,0072	0,8308	-	-	-	

Danksagung

Herrn Dr. E. Mehl danke ich für die umfassende und gründliche Einführung in das Gebiet der Rezeptorphanakologie und -biochemie sowie für die unermüdlichen Diskussionen und Anregungen während aller Stadien der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Jatzkewitz gilt mein Dank für das stets rege Interesse und für viele Anregungen sowie für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in der Neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie bis zu seiner Emeritierung. Herrn Prof. Dr. H. Thoenen danke ich für die weitere Überlassung der räumlichen und materiellen Möglichkeiten zur Fertigstellung der begonnenen Untersuchungen.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 27.12.1947 in München geboren. Nach dem Besuch der evang. Volksschule in Pasing und der staatl. Realschule in Gauting absolvierte ich das Abitur im Jahre 1968 am Rupprecht-Gymnasium in München. Von 1968 an studierte ich Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und schloß am 1.6.1977 mit dem Diplom im Hauptfach Zoologie und den Nebenfächern Biochemie, Genetik und Strahlenbiologie ab. Die Diplomarbeit fertigte ich in der Zeit vom 1.9.74 bis 30.6.75 am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Neurochemie, an. Im Jahre 1975 nahm ich das Studium der Human-Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität auf und schloß es am 2.11.1981 mit dem Wahlfach Radiologie ab. Die experimentellen Untersuchungen zur Dissertation wurden von Anfang 1976 bis Ende 1979 ebenfalls in der Neurochemischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie unter dem damaligen Direktor Prof. Dr. H. Jatzke-witz durchgeführt.

